



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



Tijana Denčić

**Ispitivanje povezanosti imunohistohemijske
ekspresije enzima popravke replikacionih
grešaka DNK sa kliničkim i mikromorfološkim
karakteristikama kolorektalnog karcinoma**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2021.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE



Tijana Denčić

**Immunohistochemical analysis of DNA mismatch
repair deficiency in colorectal carcinoma and its
association with clinical and micromorphological
features**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2021.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	Prof. dr Miljan Krstić, Medicinski fakultet u Nišu
Naslov:	Ispitivanje povezanosti imunohistohemijske ekspresije enzima popravke replikacionih grešaka DNK sa kliničkim i mikromorfološkim karakteristikama kolorektalnog karcinoma
Rezime:	Deficitarni MMR status je povezan sa dobrom prognozom, ali lošim odgovorom na pomoćnu hemioterapiju kod pacijenata sa karcinomom debelog creva i rektuma. Studija je obuhvatila 104 pacijenta mlađa od 75 godina sa hiruški resekovanim uzorcima kolorektalnog karcinoma u stadijumu II i III u periodu između 2018–2019.godine. Sve imunohistohemijske analize su urađene manuelno u laboratorijama Katedre za Histologiju i Embriologiju, na Medicinskom Fakulteta, Univerzitetu u Nišu. Gubitak nuklerne ekspresije bar jednog od MMR proteina je registrovan u 12 ispitanika (11.54%). Ova prospektivna studija jednocentrične kohorte pacijenata sa stadijumom II i III kolorektalnog karcinoma ističe klinički značaj upotrebe imunohistohemijske analize kao vodiča za dijagnostički algoritam u zemlji sa ograničenim resursima, ali sa velikom prevalencijom kolorektalnog karcinoma kod mladih pacijenata. Pokazalo se da tumori sa deficitarnim MMR-om u poređenju sa proficijentnim MMR kolorektalnim karcinomom nisu značajan prediktor preživljavanja bez bolesti i ukupnog preživljavanja.
Naučna oblast:	Medicinske nauke
Naučna disciplina:	Patologija
Ključne reči:	Adjuvantna hemioterapija; Deficitarni MMR status; Kolorektalni karcinom; Imunohistohemijska analiza
UDK:	616.348-006.6:577.175.213.3(043.3)
CERIF класификација:	B-520 Patologija
Tip licence kreativne zajednice:	CC BY-NC

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Full professor Miljan Krstic, Medical faculty of Niš
Title:	Immunohistochemical analysis of DNA mismatch repair deficiency in colorectal carcinoma and its association with clinical and micromorphological features
Abstract:	<p>Deficient mismatch repair (MMR) status is associated with good prognosis but poor therapeutic response to adjuvant chemotherapy in patients with colorectal cancer. The study enrolled 104 patients younger than 75 years of age with resected stage II and III colorectal cancer samples from the period 2018–2019. All immunohistochemistry analyses were done manually and performed in the laboratories at the Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, University of Niš. The loss of nuclear expression of at least one MMR protein was recorded in 12 (11.54%) cases. The tumors with deficient and heterogeneity MMR status were significantly associated with age up to 50 years and right-sided localization. This prospective study of a single-center cohort of patients with stage II and III colorectal cancer highlights the clinical importance of using immunohistochemistry analysis as a guide for diagnostic algorithm in a country with limited resources, but with a high prevalence of colorectal carcinoma in the young patients. MMR-deficiency tumors compared with proficient MMR colorectal cancer was not shown to be a significant predictor of disease-free and overall survival.</p>
Scientific Field:	Medical sciences
Scientific Discipline:	Pathology
Key Words:	Adjuvant chemotherapy; Deficient mismatch repair status; Colorectal cancer; immunohistochemical analysis
UDC:	616.348-006.6:577.175.213.3(043.3)
CERIF Classification:	B-520 Pathology
Creative Commons Licence Type:	CC BY-NC

SAŽETAK

Uvod i ciljevi: Deficitarni MMR status je povezan sa dobrom prognozom, ali lošim odgovorom na pomoćnu hemioterapiju kod pacijenata sa karcinomom debelog creva i rektuma. Međutim, postoje neki suprotstavljeni argumenti koji uzimaju u obzir terapijske ishode kod pacijenata sa evidentnim deficitom MMR-a. Cilj studije je ispitivanje prognostičkog značaja deficitarnog MMR statusa i ispitivanje povezanosti imunohistohemijske ekspresije deficitarnih MMR tumora sa demografskim, kliničkim i histopatološkim karakteristikama.

Materijali i metode: Studija je obuhvatila 104 pacijenta mlađa od 75 godina sa hiruški resekovanim uzorcima kolorektalnog karcinoma u stadijumu II i III u periodu između 2018–2019.godine. Sve imunohistohemijske analize su urađene manuelno u laboratorijama Katedre za Histologiju i Embriologiju, na Medicinskom Fakultetu, Univerzitetu u Nišu.

Rezultati: Gubitak nuklearne ekspresije bar jednog od MMR proteina je registrovan u 12 ispitanika (11.54%). Tumori sa deficitarnim i heterogenim MMR statusom bili su značajno povezani sa uzrastom do 50 godina i desnostranom lokalizacijom tumora ($p < 0,001$). Tokom perioda praćenja od $22,43 \pm 6,66$ meseci, 21 pacijent (20,2%) je umro, dok je 14 pacijenata (13,5%) imalo recidive. Gubitak nuklearne ekspresije heterodimernog para MLH1/PMS2 proteina, u poređenju sa proficijentnim MMR tumorima, je povezan sa kraćim preživljavanjem bez bolesti kod pacijenata sa limfovaskularnom invazijom ($p < 0,05$), perineuralnom invazijom ($p < 0,01$), stadijumom III ($p < 0,05$) i visokim histološkim gradusom tumora ($p < 0,05$). Smrtni ishod je povezan sa mucinoznom sekrecijom ($p < 0,05$), limfovaskularnom invazijom ili stadijumom III ($p < 0,05$), visokim histološkim gradusom tumora ($p < 0,001$) i prethodnim relapsom ($p < 0,001$). Jedini nezavisni prediktori ukupnog preživljavanja u multivarijantnom modelu ($\chi^2 = 27,196$, $p < 0,001$) bili su starija životna dob ($p < 0,05$) i visok histološki gradus tumora ($p < 0,05$).

Zaključci: Ova prospektivna studija jednocentrične kohorte pacijenata sa stadijumom II i III kolorektalnog karcinoma ističe klinički značaj upotrebe imunohistohemijske analize kao vodiča za dijagnostički algoritam u zemlji sa ograničenim resursima, ali sa velikom prevalencijom kolorektalnog karcinoma kod mladih pacijenata. Pokazalo se da tumori sa deficitarnim MMR-om u poređenju sa proficijentnim MMR kolorektalnim karcinomom nisu značajan prediktor preživljavanja bez bolesti i ukupnog preživljavanja.

Ključne reči: Adjuvantna hemioterapija; Deficitarni MMR status; Kolorektalni karcinom; Imunohistohemijska analiza

Naučna oblast: Medicinske nauke; **Uža naučna oblast:** Patologija

ABSTRACT

Background and objectives: Deficient mismatch repair (MMR) status is associated with good prognosis but poor therapeutic response to adjuvant chemotherapy in patients with colorectal cancer. However, there are some opposed arguments considering therapeutic outcomes in patients with evidenced MMR deficiency in colorectal cancer. The aim of the study was the investigation of prognostic value and immunohistochemical analysis of the MMR-deficiency tumors and association with demographic, clinical and histopathological features.

Materials and Methods: The study enrolled 104 patients younger than 75 years of age with resected stage II and III colorectal cancer samples from the period 2018–2019. All immunohistochemistry analyses were done manually and performed in the laboratories at the Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, University of Niš.

Results: The loss of nuclear expression of at least one MMR protein was recorded in 12 (11.54%) cases. The tumors with deficient and heterogeneity MMR status were significantly associated with age up to 50 years and right-sided localization ($p < 0.001$). During the follow-up period of 22.43 ± 6.66 months, 21 patients (20.2%) died, whereas 14 patients (13.5%) had relapses. The loss (MLH1/PMS2) expression, compared to proficient MMR tumors, was associated with shorter disease-free survival in patients with lymphovascular invasion ($p < 0.05$), perineural invasion ($p < 0.01$), stage III ($p < 0.05$) and high-grade tumor ($p < 0.05$). Death event was associated with mucinous secretion ($p < 0.05$), lymphovascular invasion or stage III ($p < 0.05$), high-grade tumor ($p < 0.001$), and previous relapse ($p < 0.001$). Only independent predictors of the overall survival in the multivariate model ($\chi^2 = 27.196$, $p < 0.001$) were older age ($p < 0.05$) and high-grade tumor ($p < 0.05$).

Conclusions: This prospective study of a single-center cohort of patients with stage II and III colorectal cancer highlights the clinical importance of using immunohistochemistry analysis as a guide for diagnostic algorithm in a country with limited resources, but with a high prevalence of colorectal carcinoma in the young patients. MMR-deficiency tumors compared with proficient MMR colorectal cancer was not shown to be a significant predictor of disease-free and overall survival.

Keywords: Adjuvant chemotherapy; Deficient mismatch repair status; Colorectal cancer; immunohistochemical analysis

Scientific field: Medical sciences; **Specific subfield:** Pathology

PODACI O KOMISIJI

PREDSEDNIK KOMISIJE:

Maja Jovičić Milentijević,

redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu,
Katedra za Patologiju

MENTOR:

Miljan Krstić,

vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu,
Katedra za Patologiju

ČLAN:

Aleksandar Petrović,

docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu,
Katedra za Histologiju i Embriologiju

ČLAN:

Branko Branković,

docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu,
Katedra za Hirurgiju

ČLAN:

Nenad Šolajić,

docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu,
Katedra za Patologiju

DATUM ODBRANE

U izradi ove doktorske disertacije svojim znanjem, podrškom, poverenjem i strpljenjem su doprineli moji učitelji, saradnici, prijatelji i moja porodica.

Zahvaljujem se svom mentoru profesoru Miljanu Krstiću na ukazanom poverenju, strpljenju, podršci, kao i na vremenu i trudu koji je uložio tokom izrade ove doktorske disertacije.

Profesoru Aleksandru Petroviću dugujem neizmernu zahvalnost. Zahvaljujem se na ličnoj i profesionalnoj podršci, entuzijastičnom pristupu nauci, pomoći tokom laboratorijskog rada, dostupnosti i korisnim savetima.

Prof. dr Maji Jovičić Milentijević dugujem zahvalnost na ukazanom poverenju, dostupnosti, podsticajima, korisnim savetima i sugestijama.

Zahvaljujem se docentu Branku Brankoviću na izuzetnoj saradnji, na ukazanom poverenju, korisnim savetima i sugestijama.

Zahvalnost dugujem docentu Nenadu Šolajiću na ukazanom poverenju, sugestijama i savetima u finalnoj izradi doktorske disertacije koji su bili od velike koristi.

Zahvaljujem se svim članovima kolektiva Centra za patologiju i patološku anatomiju, posebno članovima laboratorije koji su svojim zalaganjem u granicama svojih mogućnosti doprineli izradi doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem profesoru Goranu Radenkoviću koji mi je omogućio rad u laboratorijama na Katedri za Histologiju i Embriologiju, na ukazanom poverenju, strpljenju i podršci. Zahvaljujem se i prijatelju docentu Marku Joviću na svom zalaganju i pomoći u laboratorijskom radu.

Najveću podršku, безусловnu ljubav i razumevanje dugujem mojoj porodici, ćerki Ljubici, suprugu Predragu, roditeljima Vesni i Vojkanu, baki Divni, braći Stevanu, Savi i Urošu, teći Vukmanu, tetki Ceci i Sonji.

SADRŽAJ

1. Uvod.	1
1.1. Epidemiologija i značaj karcinoma debelog creva i rektuma	1
1.2. Etiologija kolorektalnog karcinoma	2
1.2.1. Nemodifikujući faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma	2
1.2.2. Modifikujući faktori rizika za nastanak kolorektalnog carcinoma	3
1.3. Patogeneza.	5
1.3.1. Hromozomska nestabilnost.	5
1.3.2. Mikrosatelitska nestabilnost	8
1.3.3. Metilacija CpG sekvenci.	10
1.3.4. Non-coding RNA u kolorektalnom karcinomu.	10
1.4. Klasifikacija kolorektalnih karcinoma.	11
1.4.1. Sporadični kolorektalni karcinomi	11
1.4.2. Familijarni kolorektalni karcinomi	11
1.4.3. Hereditarni kolorektalni karcinomi.	11
1.5. Klasifikacija epitelnih invazivnih tumora debelog creva i rektuma	16
1.6. Morfologija kolorektalnog karcinoma.	17
1.6.1. Makroskopske karakteristike	17
1.6.2. Mikroskopske karakteristike	20
1.6.3. Imunohistohemijski obrazac kolorektalnog karcinoma	25
1.7. Patološki prognostički faktori	26
1.7.1. Patološki stadijum bolesti	26
1.7.2. Rezidualni status	32
1.7.3. Status cirkumferentne resekcione margine	32
1.7.4. Stepen diferentovanosti.	32
1.7.5. Tumorsko pupljenje.	34
1.7.6. Imunološki odgovor od strane domaćina	37
1.7.7. Limfovaskularna invazija	39
1.7.8. Perineuralno širenje.	40

1.8. Klinička slika	41
1.9. Dijagnostika	42
1.10. Terapija	43
1.10.1. Hiruško lečenje	43
1.10.2. Hemioterapija	43
2. Hipoteza i ciljevi istraživanja	45
3. Materijal i metode	47
3.1. Materijal	47
3.2. Metode	48
3.2.1. Kvantifikacija tumorskog pupljenja	48
3.2.2. Imunohistohemijska analiza	48
3.3. Statistička analiza	50
4. Rezultati	51
5. Diskusija	79
6. Zaključak	88
7. Bibliografija	91

1.1. EPIDEMIOLOGIJA I ZNAČAJ KARCINOMA DEBELOG CREVA I REKTUMA

Kolorektalni karcinomi (engl. Colorectal cancer, CRC) danas su među značajnijim uzrocima oboljevanja i umiranja širom sveta, naročito u zemljama sa visokim ekonomskim standardom. Prema podacima Globocan-a godišnje na svetu od ovog karcinoma oboli preko 1.8 miliona novih bolesnika i 881.000 obolelih umire u 2018 godini. Sveukupno, kolorektalni karcinom je na trećem mestu po incidenci, ali na drugom mestu po stopi smrtnosti. Učestalost novoobolelih slučajeva kolorektalnog karcinoma na globalnom nivou za 2018. godinu kod oba pola je 10.2%, a mortalitet je 9.2%. U muškoj populaciji incidence je 10.9%, a mortalitet je 9.0%. U ženskoj populaciji incidence i mortalitet iznose 9.5%. Kolorektalni karcinom u muškoj populaciji se po učestalosti nalazi na trećem mestu, iza karcinoma pluća i karcinoma prostate. U ženskoj populaciji kolorektalni karcinom je drugi najčešći maligni tumor posle karcinoma dojke (Ferlay J et al., 2019).

Republika Srbija se nalazi u grupi zemalja Evrope sa srednje visokim stopama smrtnosti od kolorektalnog karcinoma. U odnosu na ostale evropske zemlje, prema podacima Globocan-a, Srbija se nalazi na devetnaestom mestu u odnosu na incidencu kod muškaraca, gde standardizovana stopa incidence iznosi 33.5%. U ženskoj populaciji se nalazi na dvadesetom mestu po standardizovanoj stopi incidence koja iznosi 21.6%.

U svetu, najveća stopa oboljevanja od karcinoma kolona kod oba pola je nadjena u delovima Evrope (Mađarska, Slovenija, Slovačka, Holandija i Norveška), Australiji/Novom Zelandu, Severnoj Americi i Istočnoj Aziji (Japan i Republika Korea, dok je u Singapuru zastupljenost veća kod žena). Stope oboljevanja u Urugvaju su takođe povišene i kod muškaraca i kod žena. Stope oboljevanja od tumora debelog creva i rektuma obično su niske u većini regiona Afrike i južne Azije. Arnold i saradnici su procenjivali trendove incidence i mortaliteta i identifikovali tri značajna obrasca: 1) porast incidence i smrtnosti u poslednjoj deceniji (uključujući Baltičke zemlje, Rusiju, Kinu i Brazil); 2) povećanje incidence, ali smanjenje smrtnosti (Kanada, Velika Britanija, Danska i Singapur); i 3) opadanje incidence i smanjenje smrtnosti (Sjedinjene Države, Japan i Francuska)

(Arnold M et al., 2017). Učestalost novoobolelih slučajeva je u Madjarskoj i Norveškoj podjednako zastupljena kod oba pola. Najveću incidencu karcinoma kolona kod muškaraca ima Južna Evropa (25.4%), a kod žena Australija/Novi Zeland (21.9%). Incidenca karcinoma rektuma ima sličnu regionalnu distribuciju kao i karcinom kolona. Najveća incidenca karcinoma rektuma kod muškaraca je u Republici Koreji, a kod žena u Makedoniji. Najveći porast mortaliteta kolorektalnog karcinoma je zabeležen u Aziji, Centralnoj i Južnoj Evropi.

U visoko razvijenim zemljama kao što je to u Sjedinjenim Američkim Državama, incidenca CRC-a iznosi 150.000 novih slučajeva godišnje. Stopa mortaliteta CRC-a je u padu, najverovatnije zbog uvođenja skrininga, bolje prevencije i efikasnosti terapije. Na smanjenje stope mortaliteta u većini razvijenih zemalja uticalo je pre svega otkrivanje karcinoma u ranom stadijumu bolesti, kvantitativne i kvalitativne promene u faktorima rizika, kao i novine u lečenju uvođenjem personalizovane terapije (Bray F et al., 2018).

1.2. ETIOLOGIJA KOLOREKTALNOG KARCINOMA

Kolorektalni karcinomi su veoma učestali tumori i čine 70% svih maligniteta koji se javljaju u gastrointestinalnom traktu. U više od 90% slučajeva je reč o adenokarcinomu, koja predstavlja najučestaliju histološku varijantu malignih tumora debelog creva i rektuma (Ponz de Leon M and Di Gregorio C, 2001).

Mnoge epidemiološke studije su pokazale da karcinomi kolona i rektuma nastaju kao posledica interakcije različitih kako genetskih faktora tako i faktora spoljne sredine. Posle 40. godine života rizik za razvoj CRC-a se znatno povećava, a kod osoba mlađih od 40. godina dijagnostikuje se u samo 2-8%. Obično se javlja nakon 50. godine života, a incidenca novoobolelih slučajeva je najveća kod osoba između 60. godine i 80. godine života. Međutim, poslednjih godina zapaža se trend povećanja broja obolelih za 1.8% kod osoba mlađih od 50 godina (Johns LE et al., 2001). Češće oboljevaju muškarci od žena u odnosu 1:4 (Bray F et al., 2018; Ferlay J et al., 2019). Za mnoge faktore rizika dokazano je da deluju direktno ili indirektno na pojavu kolorektalnog karcinoma. Faktori rizika za razvoj CRC-a mogu se podeliti na nemodifikujuće i modifikujuće faktore .

1.2.1. Nemodifikujući faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma

U nemodifikujuće faktore rizika osim starijeg životnog doba i polne distribucije ubrajaju se i ostali nemodifikujući faktori rizika za razvoj kolorektalnog karcinoma. Nasledni faktori rizika koji su

odgovorni za razvoj bolesti kod približno 20-30% obolelih, smatraju se izuzetno značajnim faktorima na koje se ne može uticati (Lynch HT et al., 2003; Jasperson KW et al., 2010).

Inflamatorne bolesti creva, ulcerozni kolitis i Kronova bolest predstavljaju važne etiološke faktore u razvoju kolorektalnog karcinoma, naročito kod pacijenata sa ekstenzivnim trajanjem bolesti i kod mlađih pacijenata (Lutgens MW et al., 2013). Verovatnoća za razvoj kolorektalnog karcinoma kod pacijenata sa Kronovom bolešću je oko 2.5%. Pacijentima sa ulceroznim kolitisom nakon trajanja bolesti više od deset godina savetuju se česte kolonoskopije sa multiplim biopsijama u cilju ranog otkrivanja, jer postoji 3.7% veći rizik za razvoj CRC-a u odnosu na opštu populaciju. Rizik od pojave CRC-a na terenu inflamatornih bolesti debelog creva zavisi od dužine trajanja bolesti i od stepena inflamacije (Bernstein CN et al., 2001; Eaden JA et al., 2001; Canavan C et al., 2006; Rizzo A et al., 2011).

Transformacija normalnog epitela debelog creva u prekanceroznu leziju i na kraju u invazivni karcinom zahteva akumulaciju velikog broja genetskih mutacija i/ili epigenetskih mehanizama. Adenomatozne polipoidne lezije predstavljaju nemodifikujuće faktore rizika, naročito ukoliko su većih dimenzija i sa višim stepenom displazije, jer postoji veća verovatnoća za pojavu maligne alteracije (Levin B et al., 2008; Bujanda L et al., 2010).

Značajan nemodifikujući faktor rizika za razvoj ovog maligniteta je pozitivna porodična anamneza. Osobe koje imaju rođaka koji je oboleo od karcinoma kolona ili rektuma u mlađem životnom dobu, imaju 3-6 puta veći rizik da obole od CRC-a. Smatra se da oko 30% osoba sa ovim oboljenjem ima pozitivnu familijarnu anamnezu, a rizik za razvoj CRC-a imaju osobe sa familijarnom adenomatoznom polipozom kolona (FAP) i Lynch sindromom (Levin B et al., 2008; Butterworth AS et al., 2006; Johns LE et al., 2001; Newcomb PA et al., 2012).

1.2.2. Modifikujući faktori rizika za nastanak kolorektalnog karcinoma

Modifikujući faktori rizika za razvoj kolorektalnog karcinoma su mnogobrojni. Tu se ubrajaju: ishrana, fizička neaktivnost, povećan index telesne mase, dijabetes melitus, pušenje cigareta, povećan unos alkohola i ostalo (Kirkegaard H et al., 2010).

Ishrana koja sadrži povećan unos crvenog mesa i mesnih proizvoda, smanjen unos nesvarljivih biljnih vlakana, veliku količinu masti i povećan unos rafiniranih ugljenih hidrata doprinosi razvoju CRC-a (Kirkegaard H et al., 2010; Aykan NF et al., 2015). Termički obradjena hrana, povećan unos nitrata i nitrita, kao i slobodni amonijak u ishrani utiču direktno ili indirektno na nastanak kolorektalnog karcinoma. N-nitro jedinjenja vezujući se za DNK mogu uzrokovati mutacije značajnih onkogena i tumor supresornih gena. Policiklični aromatični ugljovodonici i heterociklični amini takođe utiču na povećanje rizika za razvoj CRC-a (Huxley RR et al., 2009; Mayer R et al., 2016).

Mnoge studije su pokazale da smanjena fizička aktivnost, povećan index telesne mase, dijabetes melitus, pušenje cigareta povećava rizik za razvoj kolorektalnog karcinoma. Pokazano je da je rizik za razvoj CRC-a kod fizički aktivnih osoba za 25% manji u odnosu na fizički neaktivne osobe (Kirkegaard H et al., 2010; Samad AK et al., 2005; Wolin KY et al., 2009). Gojaznost se takođe izdvaja kao značajan faktor koji povećava rizik od oboljevanja kod osoba oba pola. Rizik za razvoj karcinoma debelog creva i rektuma je oko 20% veći kod muskaraca i žena sa prekomernom težinom u odnosu na osobe sa normalnom telesnom masom (Larsson SC et al., 2007; Huxley RR et al., 2009; Wang Y et al., 2008). Tolerancija na insulin se razvija kod gojaznih osoba što dovodi do povećanja koncentracije cirkulišućeg insulina. U uslovima kada je povišena koncentracija insulina povećava se i nivo inslinu sličnog faktora rasta tipa I (engl. Insuline like Growth Factor type I, IGF-I) koji stimuliše proliferaciju ćelija intestinalne mukoze i time povećava rizik za razvoj karcinoma debelog creva (Durko L et al., 2014; Larsson SC et al., 2005). Oko 12% mortaliteta je povezano sa povećanim unosom nikotina. Kancerogena hemijska jedinjenja duvanskog dima kao što su: acetaldehid, benz-pireni, aromatični amini i N-nitrozamini vezujući se za molekule DNK, uzrokuju poremećaj funkcije gena i replikaciju i dovode do razvoja tumora (Huxley RR, et al., 2009). Acetaldehid kao primarni metabolit dovodi do oštećenja DNK uzrokujući nekontrolisanu proliferaciju ćelija. Povećan unos alkohola takođe je povezan sa povećanim rizikom od razvoja karcinoma u oko 23% slučajeva. Ekscesivna konzumacija alkoholnih pića prema brojnim studijama povećava rizik od nastanka karcinoma (Kirkegaard H et al., 2010; Wang Yet al., 2015).

Sekundarne žučne kiseline, poput deoksiholične kiseline i litholične kiseline, povezane su sa povećanim rizikom od nastanka CRC-a. Žučne kiseline nastaju nakon enzimske dekonjugacije i dehidroksilacije primarnih žučnih kiselina u debelom crevu pod dejstvom anaerobnih bakterija. Kinetika epitelnih ćelija pokazuje da žučne kiseline menjaju proliferativnu aktivnost ćelija sluzokože debelog creva, povećanjem broja DNK koji sintetišu ćelije i proširuju proliferativni odeljak kripte sve do srednje trećine. Povećana stopa proliferacije može povećati rizik od nastanka mutacija i maligne alteracije. Izloženost epitelnih ćelija sluzokože debelog creva visokim fiziološkim koncentracijama žučnih kiselina indukuje stvaranje reaktivnih slobodnih radikala kiseonika, što izaziva oksidativna oštećenja i mitotske aberacije koje mogu dovesti do promena DNK, nestabilnosti genoma i maligne transformacije (Moorehead RJ et al., 1987).

Nasuprot navedenim faktorima, postoji mali broj faktora koji deluju protektivno u smislu smanjenja rizika za razvoj CRC-a. To je, pre svega, povećana fizička aktivnost, povećan unos dijetetskih vlakana, voća i povrća, suplemenata koji deluju antikancerogeno kao što su: folna kiselina, vitamini D, E, A i C, selen, kalcijum, primena nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL), probiotika, oralnih kontraceptiva i drugo. Mnoge epidemiološke studije su pokazale da upotreba NSAIL i aspirina ima zaštitno dejstvo u smislu smanjenja rizika za pojavu karcinoma debelog creva. Upotreba ovih lekova u dugom vremenskom periodu, tokom deset godina i duže, smanjuje

incidencu oboljevanja. Inhibicijom ciklooksigenaze 2 (COX-2), enzima koji je eksprimiran kod oko 90% karcinoma, postiže se efekat ovih lekova. COX-2 podstiče produkciju prostaglandina E₂ (PGE₂) koji inhibira proces apoptoze, stimuliše angiogenezu i podstiče proliferaciju epitelnih ćelija (McCullough ML et al., 2003; Giovannucci E et al., 2010; Kim SE et al., 2014).

1.3. PATOGENEZA

Preovlađujuća paradigma je da je ćelija porekla većine kolorektalnih karcinoma matična ćelija ili ćelija nalik matičnoj ćeliji koja se nalazi u osnovi kripti debelog creva (Zeki SS et al., 2011). U ovom modelu, mutacije onkogene i tumor supresornih gena u ovim ćelijama dovode do stvaranja matičnih ćelija karcinoma, koje su od suštinskog značaja za pokretanje i progresiju tumora. Kolorektalni karcinomi su heterogena grupa tumora koji nastaju progresivnom akumulacijom genetskih mutacija i epigenetskih promena koje aktiviraju onkogene i inaktiviraju tumor supresorne gene. Gubitak genomske i/ili epigenomske stabilnosti primećen je u većini ranih neoplastičnih lezija u debelom crevu (aberrantna kriptična žarišta, adenomi i nazubljene polipoidne lezije) i verovatno je centralni molekularni i patofiziološki događaj u inicijaciji i progresiji CRC-a (Grady W Met al., 2008). Gubitak genomske i epigenomske stabilnosti ubrzava akumulaciju mutacija i epigenetskih promena u tumor supresornim genima i onkogenima, koji pokreću malignu transformaciju ćelija debelog creva kroz runde klonske ekspanzije koje biraju one ćelije sa najagresivnijim i najmalignijim ponašanjem.

Najznačajniji putevi kolorektalne karcinogeneze su: hromozomska nestabilnost (engl. Chromosomal instability, CIN), mikrosatelitska nestabilnost (engl. Microsatellite instability, MSI) i metilacija CpG sekvenci (Cysik AL et al., 2018, Nojadeh JN et al., 2018).

1.3.1. Hromozomska nestabilnost

Hromozomska nestabilnost nastaje kao posledica akumulacije promena u strukturi i broju hromozoma (Slika 1). Kod pacijenata sa sporadičnim kolorektalnim karcinomom i familijarnom adenomatoznom polipozom kolona CIN se javlja kod oko 75% pacijenata. Karakterišu je akumulacije mutacija različitih gena, aneuploidije i hromozomski rearanžmani (Lengauer C et al., 1998; Rowan A et al., 2005). Kolorektalni karcinomi nastaju u toku višestepenog procesa kolorektalne karcinogeneze (Fearon ER et al., 1990) koju su 1990. godine predložili Fearon i Vogelstein i koja je postala paradigma za progresiju tumora.

Početni korak u kolorektalnoj karcinogenezi je stvaranje aberantnih kriptičnih fokusa (engl. Aberrant crypt foci, ACF). ACF su prekancerozne lezije kolorektalnog karcinoma čija je veličina i broj direktno povezana sa povećanim rizikom od razvoja karcinoma debelog creva (Takayama T et al., 1998). Oni su definisani kao izmenjeni kriptični klasteri sa ovalnim ili pukotinastim lumenima, zadebljanim epitelom, većih su dimenzija od normalnih kripti i tamnije se prebojavaju na histološkim preseccima bojenim klasičnom hematoksilin-eozin (HE) metodom u odnosu na okolnu neizmenjenu sluzokožu debelog creva. ACF su prvo otkriveni u debelom crevu glodara lečenih kancerogenima specifičnim za debelo crevo, a tek kasnije su identifikovani kod pacijenata koji su pod visokim rizikom od CRC-a (Siu IM et al., 1997).

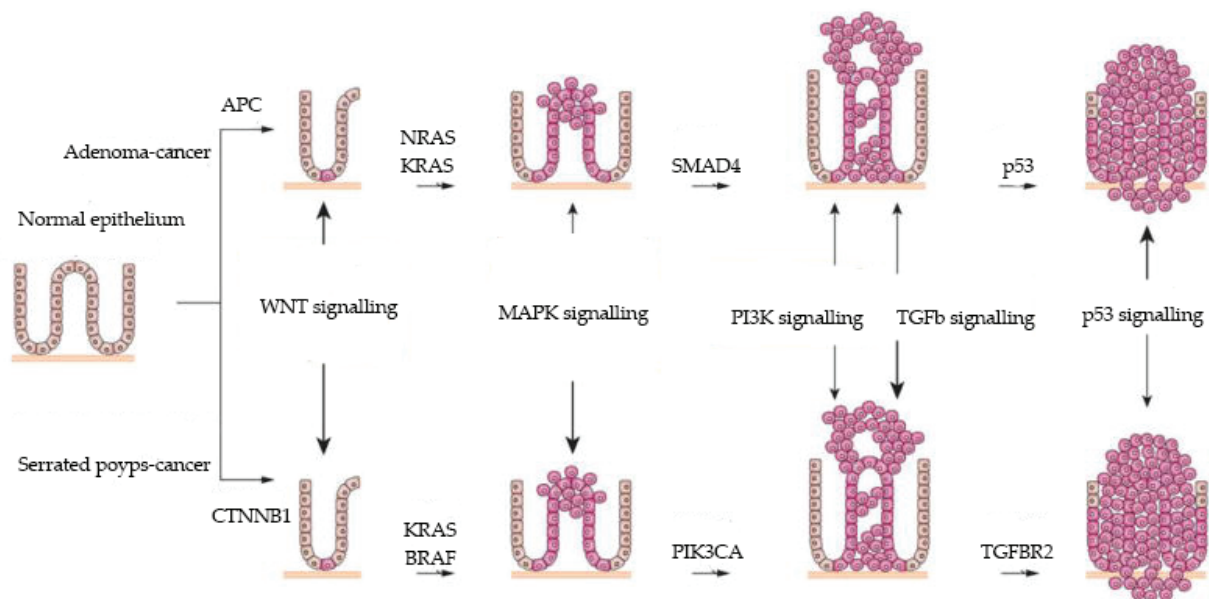
Aktivacija Wnt puta signalizacije može se dogoditi u ovoj fazi kao rezultat inaktivacije tumor supresornog gena adenomatozne polipoze kolona (engl. Adenomatous Polyposis Coli, APC) na hromozomu 5q21. Inaktivacija APC gena nastaje putem germinativnih i somatskih mutacija ili hipermetilacijom promotornog regiona (Powell S et al., 1992). Germinativne mutacije se često javljaju kod pacijenata sa FAP-om. Somatske mutacije se javljaju kod 30% do 70% sporadičnih adenoma i kod 5% ACF. Inaktivacija uzrokovana hipermetilacijom javlja se kod oko 12% primarnih kolorektalnih karcinoma i adenoma (Kinzler KW et al., 1996; Otori K et al., 1998; Miyaki M et al., 1994).

Progresija ka većim adenomima i ranim karcinomima zahteva aktivaciju proto-onkogeno KRAS na 12p12 hromozomu. KRAS protein kodiran od strane istovetnog gena ima ulogu u transdukciji signala koji oscilira između aktivnog i inaktivnog stanja kada je vezan za guanozin-difosfat. Mutirani KRAS proto-onkogen ometa hidrolizu guanozin-trifosfata koji je neophodan da bi se pretvorio u inaktivno stanje i kao takav stimuliše putanju MAP kinaze za prenos signala u jedro, što dovodi do kontinuirane proliferacije i maligne alteracije ćelija (Armaghany T et al., 2012). Mutacija KRAS proto-onkogeno je nađena u 30-50% CRC-a (Santini D et al., 2008).

Inaktivacija tumor supresornog gena TP53 registrovana je kod 70% karcinoma i kod 5% adenoma, a dešava se nešto kasnije u toku kolorektalne tumorogeneze. P53 je protein kodiran od strane istovetnog TP53 gena, sastavljenog od mase proteina (53 kilodaltona) po čemu je i dobio naziv. Značajan je za sve ćelije u kojima kontroliše ćelijski ciklus i čuva stabilnost genoma. Protein p53 jedan je od najproučavanijih proteina u brojnim studijama. Objavljeno je više od 50.000 radova o mehanizmu i funkciji p53 proteina. Kada dođe do grešaka ili mutacija, p53 zaustavlja ili usporava ćelijski ciklus u fazi G1/S ukazujući na oštećenja DNK. Nakon toga započinje regeneraciju DNK povećanjem transkripcije gena inhibitora ciklin-zavisne kinaze CDKN1A (p16) i aktivacijom proteina GADD45 (engl. Growth Arrest DNA Damage). Ukoliko je oštećenje DNK preopsežno da bi se regenerisalo, p53 izaziva apoptozu preko kaspaznog puta posredstvom proapoptotskih gena BAX, PUMA isključivanjem mitohondrijske funkcije. Protein p53 aktiviraju brojni faktori, među kojima su ultraljubičasto zračenje, oksidativni i osmotski stres, hemikalije, virusi i ostalo (Baker SJ et al., 1990; Purdie CA et al., 1991).

Mutacije tumor supresornih gena dekapentaplegičnih (SMAD) homolog proteina, SMAD2, SMAD4, SMAD7 i mutacije gena DCC (engl. Deleted in Colorectal Cancer, DCC) na lokaciji 18q21, su otkrivene kod oko 70% karcinoma. SMAD geni imaju važnu ulogu u kancerogenezi jer kodiraju delove signalne putanje transformišućeg faktora rasta beta (engl. Transforming growth factor beta, TGF- β) (Fearon ER et al., 1990; Armaghany T et al., 2012; Takagi Y et al., 1998; Takagi Y et al., 1996). TGF- β kao plejotropni faktor rasta ima brojne uloge. Učestvuje u ćelijskoj proliferaciji, diferencijaciji, adheziji, migraciji, ćelijskoj smrti, a kasnije sa progresijom tumora je uključen i u kancersku invaziju i metastaziranje.

Patogeneza sporadičnih CRC-a nije ista kod svih karcinoma, već postoji nekoliko alternativnih molekularnih puteva od kojih svaki podrazumeva specifične somatske mutacije uključujući tačkaste mutacije, amplifikacije, delecije i rearanžmane specifičnih gena. Ovim putem dolazi do gubitka sekvenci u jednom od roditeljskih hromozoma što dovodi do gubitka heterozigotnosti (LOH) u pet hromozoma (Thiagalingam Set al., 2001). Mutaciona aktivacija fosfatidil inozitol 3 kinaze (engl. Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) javlja se kasno u adenom-karcinom sekvenci u oko 20% kolorektalnih karcinoma (Samuels Y et al., 2004).

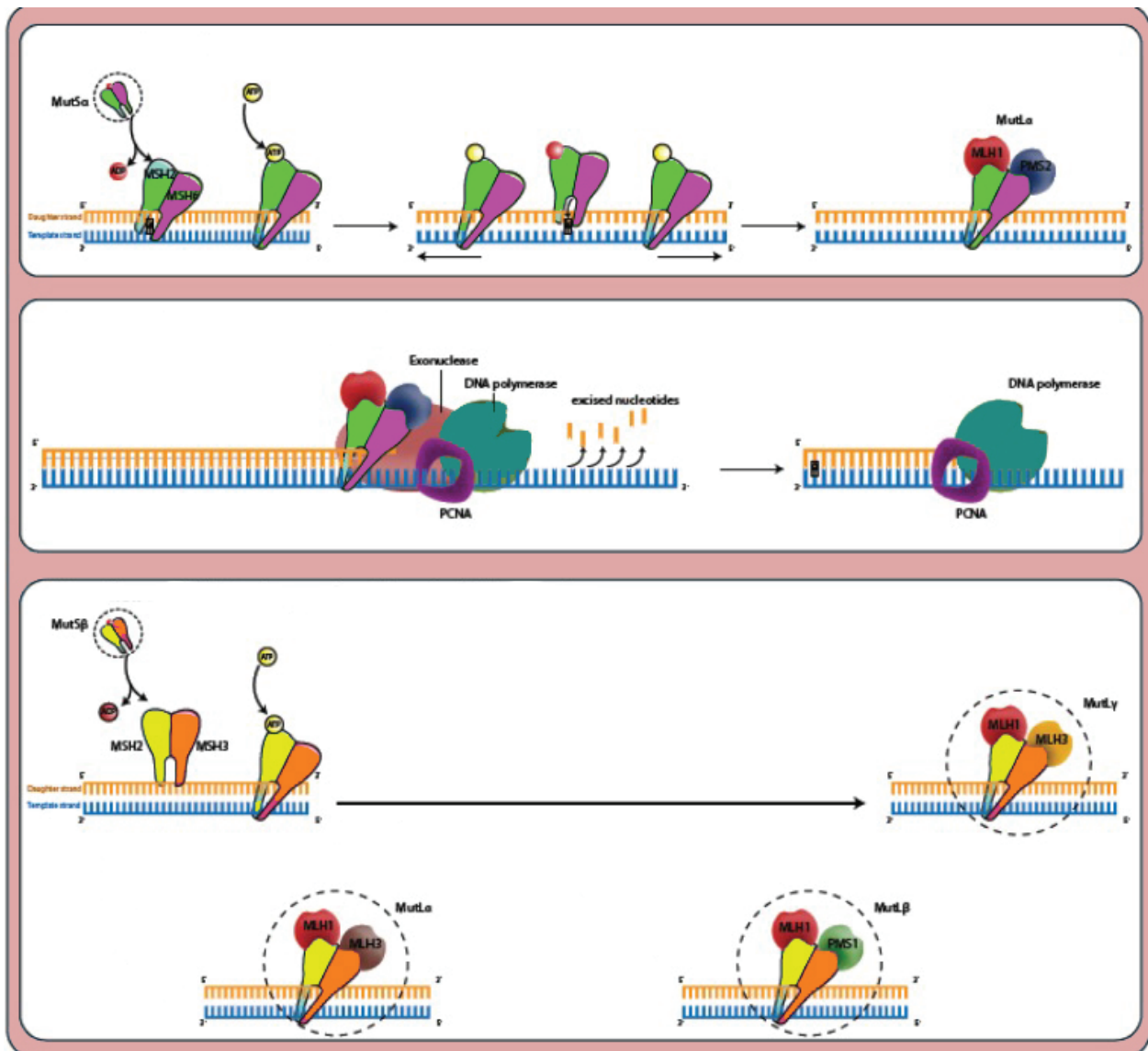


Slika 1. Šematski prikaz različitih molekularnih puteva u nastanku kolorektalnog karcinoma

1.3.2. Mikrosatelitska nestabilnost

Kod mikrosatelitske nestabilnosti ne postoje vidljive promene u broju i strukturi hromozoma što je slučaj kod karcinoma nastalih putem hromozomske nestabilnosti (Fujiyoshi K et al., 2017). Kod MSI karcinoma su prisutne promene na nivou mikrosatelita (Gibson J et al., 2014). Mikrosateliti poznati kao kratki tandem ponovci (engl. Short Tandem Repeats, STR) predstavljeni su sekvencama dužine 1 do 6 nukleotida koje čine ponavljajuće motive, čineći oko 3% ljudskog genoma (Chen W et al., 2017). Najveći broj mikrosatelitskih sekvenci se nalazi u nekodirajućem delu gena. Neki geni koji imaju ulogu u održavanju integriteta genoma, u regulaciji proliferacije ćelija i u apoptozi, imaju u svom kodirajućem delu gena mikrosatelitske sekvence. Gubitak funkcije postreplikacione popravke DNK može da dovede do nakupljanja mutacija i do inicijacije i progresije tumora (Battaglin F et al., 2018).

MMR proteini (mutL homologue 1 (MLH1), mutS homologue 2 (MSH2), mutS homologue 6 (MSH6) i postmeiotic segregation increased 2 (PMS2)) kodirani od strane istovetnih MMR gena su nuklearni enzimi koji učestvuju u popravljavanju neusklađenosti baze i baze i/ili petlje za umetanje-brisanje tokom replikacije DNK u ćelijama koje proliferišu (Jiricny J, 2006). Inaktivacija jednog od ovih gena, usled somatskih i germinativnih mutacija ili epigenetskog prigušivanja, rezultira poremećajem funkcionisanja MMR sistema i razvojem mikrosatelitske nestabilnosti. Proteini formiraju heterodimerne komplekse koji se vezuju za područja izmenjene DNK i započinju njegovo uklanjanje. MLH1 fakultativni protein u toku normalne aktivacije popravke neusklađenosti DNK regrutuje svog obligatnog partnera PMS2 na mesto popravke DNK i formira heterodimerni kompleks MLH1/PMS2. Ekspresija svakog proteina u heterodimeru zavisna je od ekspresije njegovog para. Kada je MLH1 mutiran i/ili epigenetski utišan gubi se iz heterodimernog kompleksa za popravak neusklađenosti DNK. U tom slučaju će i PMS2 biti odsutan iz proteinskog kompleksa. Isto važi i za MSH2 protein i njegovog vezujućeg partnera MSH6 proteina. Međutim u slučaju gubitka ekspresije PMS2 ili MSH6 proteina, ekspresija MLH1 i MSH2 proteina ostaje očuvana pri imunohistohemijskoj analizi, jer oni mogu pronaći druge MMR proteine i sa njima formirati heterodimerne komplekse-Slika 2 (Aaltonen L et al., 1993).



Slika 2. Šematski prikaz molekularnih karakteristika „mismatch repair“ proteina

Mikrosatelitska nestabilnost nastaje usled inaktivacije gena odgovornih za reparaciju grešaka nastalih u toku replikacije DNK, kako je već pomenuto. Inaktivacija nekog od MMR gena je neophodna ali nekada nije dovoljna za malignu transformaciju ćelije. Opisano je preko trideset gena koji predstavljaju target gene za MSI. Target geni sadrže mikrosatelitske sekvence koje su sklone mutacijama tokom kancerogeneze. Prvi otkriven tumor-supresorni gen 1995. godine je receptor za transformišući faktor rasta $\beta 2$ (engl. Transforming growth factor beta receptor 2, TGF β R2). Ovaj gen sadrži mikrosatelitsku sekvencu u svom kodirajućem delu regiona koja je sastavljena od 10 nukleotida adenina i koja čini ponavljajuće motive. Veliki procenat MSI kolorektalnih karcinoma u kodirajućem delu ovog regiona ima registrovanu deleciju 1-2 bazna para. Drugi opisani geni koji sadrže mikrosatelitske sekvence unutar kodirajućih dela regiona su sledeći: BAX (proapoptotski gen; Bcl-2-Associated X protein; sadrži 8 nukletida guanina), MSH3 kao i IGF1IR (engl.

Insulin-like Growth Factor II receptor; sadrži 8 vezanih nukleotida guanina). Mikrosatelitski markeri, BAT-25 i BAT-26, predstavljaju mikrosatelitske sekvence koje se nalaze u nekodirajućem delu regiona. Nađena je pozitivna povezanost između veličine delecije baznih parova u ovim nekodirajućim mikrosatelitskim sekvencama sa brojem mutiranih target gena (Markowitz S et al., 1995, Duval A et al., 2001).

Savremena podela kolorektalnog karcinoma uključuje podelu karcinoma u dve velike grupe, mikrosatelitski stabilne i mikrosatelitski nestabilne karcinome. U nekim ustanovama testiranje se sprovodi samo u slučajevima postojanja sumnje na Linčov sindrom kod pacijenata koji ispunjavaju Betezda kriterijume. Međutim, postoje preporuke o testiranju svih novootkrivenih slučajeva na postojanje mutacija MMR gena kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom u cilju adekvatne personalizovane terapije (Provenzale D et al., 2018).

1.3.3. Metilacija CpG sekvenci

Aberantna metilacija CpG sekvenci unutar promotornog regiona gena i/ili egzona/introna je prepoznatljiv epigenetski događaj koji dovodi do utišavanja transkripcije. Bez obzira na biološke posledice metilacije CpG sekvenci izazvane utišavanjem tumor supresornih gena, ova epigenetska promena može poslužiti kao obećavajući biomarker za rano otkrivanje karcinoma (Chirieac LR et al., 2005). Pored toga, obrasci metilacije DNK mogu se primeniti u molekularnoj klasifikaciji tumora, u predviđanju terapijskog odgovora i prognozi bolesti.

Kako se poboljšava naše razumevanje uloge epigenetskih promena u tumorogenezi CRC-a, mogle bi se razviti ciljane terapijske procedure zasnovane na epigenetskim mehanizmima. Metilacija CpG sekvenci se javlja kod sporadičnih mikrosatelitski nestabilnih kolorektalnih karcinoma, a u 80-90% slučajeva se ostvaruje hipermetilacijom promotornog regiona MLH1 gena. Ovako nastao fenotip kolorektalnih karcinoma se označava kao CpG metilacioni fenotip (Toyota M et al., 1999). Gazzoli i saradnici (Gazzoli I et al., 2002) su prvi identifikovali ovaj fenomen i utvrdili gubitak ekspresije MLH1 u tumorskom tkivu. Ligtenberg i saradnici su 2009. godine predložili alternativni mehanizam nastanka dMMR tumora i identifikovali su tumore sa deficitom MSH2 proteina (Ligtenberg MJ et al., 2009).

1.3.4. Non-coding RNA u kolorektalnom karcinomu

Samo 2% ljudskog genoma sadrži gene koji kodiraju proteine. Preostalih 98% je transkribovano u neprotein kodirajuće RNA. Postoje različite vrste RNA: duge nekodirajuće RNA (lncRNA), mikro RNA (miRNA), male interferirajuće RNA (siRNA) i RNA-interaktivne (piRNA) prisutne kod eukariota. Mikro RNA su male (20-25 nukleotida) jednolančane nekodirajuće RNA koje inhibiraju ekspresiju gena, vezivanjem na 3'UTR sekvencu ciljane mRNA transkripta. Vezivanje se vrši spa-

janjem baznih parova između miRNA i ciljane mRNA, što dovodi ili do degradacije transkripta ili do inhibicije transkripcije. Mikro RNA mogu delovati kao tumor supresorni geni inaktivirajući onkogene, ili kao onkogeni miRNA (oncomiRs) inaktivirajući tumor supresorne gene. Zbog nestabilnosti genomskih regiona, ekspresija miRNA se često menja kod karcinoma. Male interferirajuće RNA deluju na sličan način kao i miRNA inhibirajući ekspresiju gena (Lin S et al., 2015; Xiong XD et al., 2016).

1.4. KLASIFIKACIJA KOLOREKTALNIH KARCINOMA

Kolorektalni karcinomi se javljaju u tri osnovne forme, kao sporadični, familijarni ili hereditarni.

1.4.1. Sporadični kolorektalni karcinomi

Sporadični kolorektalni karcinomi se javljaju kod osoba starije životne dobi i nastaju kao posledica interakcije različitih genetskih faktora i faktora spoljne sredine. Predstavljaju najučestaliji tip karcinoma sa zastupljenošću oko 75% slučajeva, bez značajne familijarne istorije (Lengauer C et al., 1998; Rowan A et al., 2005). Smatra se da oko 12% do 20% sporadičnih karcinoma kolona i rektuma nastaje kao posledica mikrosatelitske nestabilnosti. Dakle, mutacije MMR gena su retke u sporadičnim slučajevima, a najvažniji mehanizam za inaktivaciju MMR gena je bialelna hipermetilacija promotornog regiona MLH1 gena. (Chen W et al., 2017).

1.4.2. Familijarni kolorektalni karcinomi

Familijarni kolorektalni karcinomi nemaju jasnu genetsku osnovu (Nojadeh JN et al., 2018). Zastupljenost ovih karcinoma je u oko 20% slučajeva i oni pokazuju familijarno javljanje (Rustgi AK, 2007).

1.4.3. Hereditarni kolorektalni karcinomi

Hereditarna forma kolorektalnih karcinoma se javlja u oko 5% slučajeva, a geni nosioci nasleđenih mutacija su dobro poznati (Nojadeh JN et al., 2018). Hereditarne kolorektalne karcinome čini grupa polipoznih i grupa nepolipoznih sindroma. U grupu polipoznih sindroma se ubrajaju sledeći sindromi: familijarna adenomatozna polipoza kolona, Gardnerov sindrom, Turcot sindrom, hamartomatozni Peutz Jeghersov sindrom i drugi ređi sindromi (Scarpa M et al., 2015).

Familijarna adenomatozna polipoza (FAP) se nasleđuje autozomno-dominantno. Udružena je sa inaktivacijom gena adenomatozne polipoze kolona koji je otkriven 1991.godine (APC gen, lokalizovan na hromozomu 5p21). Najveći broj mutacija na APC genu su frameshift, nonsense ili splice-site mutacije. Druge ređe mutacije su mutacije gena K-RAS, DCC, P53, COX-2, BCL-2 i druge (Powell S et al., 1992; Kinzler KW et al., 1996; Otori K et al., 1998; Zeichner et al., 2012). APC gen je tumor supresorni gen koji je odgovoran za produkciju APC proteina koji je deo WNT puta signalizacije. Ovaj gen kontroliše brzinu ćelijskog rasta i sprečava razvoj tumora. Glavna uloga APC proteina je u razgradnji citoplazmatskog proteina, beta katenina. Degradacija citoplazmatskog beta katenina se odvija pomoću APC/Axin/GSK3 kompleksa. Njegovom mutacijom dolazi do stvaranja APC proteina koji onemogućava formiranje kompleksa i degradaciju beta katenina što rezultuje njegovim nagomilavanjem, što kasnije ima za posledicu aktivaciju transkripcije gena i stimulaciju ćelijske proliferacije (Nojadedh JN et al., 2018). Sluzokoža proksimalnog dela kolona, ređe rektuma je gotovo u potpunosti prekrivena velikim brojem polipoidnih lezija, čiji broj u nekim slučajevima dostiže i nekoliko hiljada. Postoje dva oblika: klasični FAP-teži oblik (sa preko 100 polipoidnih promena, bolest se ranije ispoljava, a klinička slika je teža) i atenuisani FAP-blaži oblik (koji se karakteriše prisustvom manje od 100 polipoidnih lezija, kasnijim ispoljavanjem bolesti i blažom kliničkom slikom). Postoji i nekoliko ekstrakoloničnih manifestacija koje se često javljaju kod pacijenata sa FAP-om. To su polipoidne lezije želuca i duodenuma, dezmoidni tumori, kongenitalna hipertrofija pigmentnog dela retine, osteomi, anomalije zuba, ciste i maligni tumori različitih lokalizacija. S obzirom na činjenicu da će 100% bolesnika najkasnije do 40. godine razviti karcinom, preporučuje se profilaktička hirurška resekcija praćena godišnjim endoskopskim pregledima preostalog dela debelog creva i rektuma (Lynch HT et al., 2003).

Hamartomatozni Peutz Jeghers-ov sindrom je veoma redak autozomno-dominantni sindrom koga karakterišu hamartomatozne gastrointestinalne polipoidne lezije koje su udružene sa pojavom mukokutanih melaninskih pigmentacija. Otkriven tumor supresorni gen serin-treonin kinaze za ovaj nasledni sindrom (STK11) je lokalizovan na 19p13.3 hromozomu. Melaninske pigmentacije su prisutne na usnama, u sluzokoži usne duplje, očnim kapcima, oko anusa, na genitalijama i palmarnoj strani ruku. Polipoidne lezije su najčešće lokalizovane u tankom crevu, a mogu biti prisutne u debelom crevu i u želucu. Javljaju se oko 25. godine života. Osobe sa ovim hamartomatoznim naslednim sindromom imaju povećan rizik za razvoj karcinoma creva, ali i tumora uterusa, dojke, želuca i pankreasa (Hemminki A et al., 1998; Jenne DE et al., 1998; Chae HD and Jeon CH, 2014).

Gardnerov sindrom se nasleđuje autozomno-dominantno. Spada u grupu sindroma polipoze kolona. Nastaje kao posledica mutacije različitih gena: APC, KRAS, DCC i TP 53 gena. Kod bolesnika su prisutne brojne polipoidne promene lokalizovane u kolonu i tankom crevu. Javljaju se i ekstrakolonične manifestacije kao što su: osteomi kostiju lica i drugih kostiju, lipomi, fibromi,

karcinomi tiroidne žlezde, nadbubrežne žlezde, jetre, bilijarnih puteva i tumori drugih lokalizacija. Zbog velikog broja polipoidnih lezija postoji povećana verovatnoća za razvoj karcinoma debelog creva (Pinto RS et al., 2018; Yang A et al., 2018; Kiessling P et al., 2019).

Turcotov sindrom se nasleđuje autozomno-recesivno. Predstavlja veoma retku polipozu kolona koja je udružena sa tumorima centralnog nervnog sistema (meduloblastomom i glioblastomom multiforme). Nastaje kao posledica mutacije APC gena ili kao posledica mutacije nekog od gena iz MMR grupe. Najčešće opisane mutacije gena iz MMR grupe su: MLH1, MSH6 i PMS2 gena. Mutacije APC gena su povezane sa nastankom meduloblastoma, dok su mutacije MMR gena povezane sa razvojem glioblastoma multiforme (Turcot J et al., 1959; Hamilton SR et al., 1995).

Muir Torre sindrom je autozomno-dominantno oboljenje, koje je prvi put opisano 1967. godine. U 90% slučajeva su prisutne germinativne mutacije MSH2 i MSH6 gena, dok manji broj čine mutacija MLH1 i PMS2 gena odgovorne za razvoj CRC-a (Mercader P, 2010). Za ovaj sindrom su karakteristične kutane neoplazme. Najčešći je sebacealni adenom koji se kod osoba mlađih od 50. godina prezentuje žućkastim nodulusima, često u predelu glave i vrata. Inicijalni dijagnostički test je određivanje deficita MMR proteina imunohistohemijskom analizom ili detekcija mikrosatelitske nestabilnosti PCR testom (Vidal CI et al., 2019; McCarthy RL et al., 2019).

MUTYH-udružena polipoza je jedan od hereditarnih polipoznih sindroma koji se nasleđuje autozomno-recesivno. Nastaje kao posledica mutacije MUTYH (MutY DNK glycosylase) gena lokalizovanog na hromozomu 1p34.1. MUTYH gen kodira sintezu enzima MUTYH glikozilaze koja je uključena u popravku grešaka DNK putem isecanja nukleotida. Kod bolesnika se javljaju polipi gastrointestinalnog trakta kao kod atenuisane familijarne adenomatozne polipoze (Pezzi A et al., 2009; Syngal S et al., 2015). Dijagnoza se postavlja između 30. godine i 60. godine života. Ukoliko se ne prepozna na vreme i adekvatno ne leči postoji 80% veća verovatnoća za razvoj kolorektalnog karcinoma. Većina CRC-a kod pacijenata sa ovom polipozom je mikrosatelitski stabilna, kod malog broja bolesnika je nađena mikrosatelitska nestabilnost. MMR geni mogu interagovati sa MUTYH genom i povećati rizik za nastanak CRC-a (Poulsen ML and Bisgaard ML, 2009).

Seratni polipozni sindrom je relativno redak sindrom, koga karakteriše povećan broj seratnih nazubljenih polipoidnih lezija kolona (Chow E et al., 2006). Postoji tri kriterijuma za dijagnozu, a jedan od kriterijuma mora biti prisutan. Kriterijumi su sledeći: najmanje pet polipoidnih lezija u proksimalnom kolonu i sigmoidnom kolonu i najmanje dva veća od 1cm; bilo koji broj polipa u proksimalnom kolonu; i više od dvadeset polipa bez obzira na lokalizaciju u kolonu. Kod ovih pacijenata postoji povećan rizik za razvoj CRC-a najčešće proksimalne lokalizacije sa ili bez mikrosatelitske nestabilnosti odnosno deficita MMR statusa (Snover DC et al., 2010).

Grupa nepolipoznih sindroma (engl. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC) ne nastaje na terenu polipoze kolona i rektuma i ovu grupu čini Linčov sindrom i familijarna forma X kolorektalnog karcinoma (Lindor NM et al., 2009).

Familijarna forma X kolorektalnog karcinoma podrazumeva karcinome kolona i rektuma koji ispunjavaju Amsterdamske kriterijume, a genetska osnova ovog sindroma nije dokazana (Geary J et al., 2008).

Linč sindrom (engl. Lynch syndrome, LS) je najčešći nasledni sindrom koji dovodi do razvoja kolorektalnog karcinoma. Ovaj sindrom čini 2–4% svih slučajeva HNPCC (Geary J et al., 2008; Chung D et al., 2003). Nasleđuje se autozomno-dominantno i uzrokovan je germinativnom mutacijom nekog od gena iz MMR grupe, odgovornih za popravku pogrešno sparenih baza DNK (Lynch HT et al., 2004). Oštećenje nekog od gena dovodi do razvoja mikrosatelitske nestabilnosti, uključujući MSH2 na hromozomu 2p16, MLH1 na hromozomu 3p21, MSH6 na hromozomu 2p16 i PMS2 na hromozomu 7p22 (Lynch et al., 2009). Najveći broj slučajeva ima otkrivene MSH2 i MLH1 germinativne mutacije, u više od 90% slučajeva (Lynch and Shaw, 2013). Nosioci germinativnih mutacija MSH6, PMS2, MLH1 i MSH2 imaju različiti klinički fenotip. Nosioci MSH6 mutacija imaju manji rizik za razvoj kolorektalnog karcinoma i kasniji početak bolesti u odnosu na nosioce PMS2 mutacija. Nosioci MLH1 mutacija imaju veći rizik od nastanka CRC-a u mlađem životnom dobu i češće se javljaju kod muškaraca u odnosu na nosioce MSH2 mutacija. Sa druge strane, nosioci MSH2 mutacija, imaju veći rizik za razvoj karcinoma mokraćne bešike (Baglietto L et al., 2010; Pi S et al., 2017;). Prvi put su opisani 1895. godine od strane patologa Warthin-a. U zavisnosti od toga koji je gen oštećen mutacijom, mogu da se razviju karcinomi različitih lokalizacija kao što su: karcinomi endometrijuma, ovarijuma, urinarnog trakta, želuca, tankog creva, pankreasa, žučnih puteva, mozga i lojnih žlezda. Linčov I sindrom podrazumeva isključivo zahvaćenost kolona i rektuma. Linčov II sindrom uključuje malignitete i na drugim lokalizacijama. Bolesnici sa LS imaju predispoziciju za razvoj više karcinoma istovremeno i u toku života. Zbog značaja u ranom otkrivanju, formirani su najpre Amsterdam I kriterijumi 1991. godine koji su 1998. godine revidirani (Vasen HF et al., 1999; Rodriguez-Bigas MA et al., 1997). Zatim su formirani i Betezda kriterijumi (engl. Bethesda) osnovni i revidirani klinički kriterijumi za identifikaciju ovih pacijenata (Rodriguez-Bigas MA et al., 1997; Umar A et al., 2004). Amsterdamski I kriterijumi podrazumevaju sledeće: najmanje jedan član porodice ima verifikovan kolorektalni karcinom koji je dijagnostikovao pre 50. godine života; jedan član porodice je u prvom kolenu srodstva sa ostala dva; više od dve uzastopne generacije su pogođene bolešću; nema dokaza o postojanju FAP. U Amsterdamske II kriterijume se svrstavaju sledeći: više od tri člana porodice imaju verifikovan karcinom; jedan član porodice je u prvom kolenu srodstva sa ostala dva; više od dve uzastopne generacije su zahvaćene bolešću; najmanje jedan član porodice ima karcinom dijagnostikovao pre 50. godine života; nema dokaza o postojanju FAP. Betezda kriterijumi podrazumevaju sledeće: kolorektalni karcinom dijagnostikovao kod pacijenta pre 50. godine života; prisustvo sinhronih i me-

tahronih karcinoma ili drugih tumora povezanih sa HNPCC-om bez obzira na starost pacijenata; osobe sa kolorektalnim karcinomom i članovi porodice u prvom kolenu srodstva, pri čemu je jedan od karcinoma patohistološki verifikovan pre 50. godine života; osobe sa slabodiferentovanim kolorektalnim karcinomom desnostrane lokalizacije verifikovanim pre 50. godine života; osobe sa „signet ring cell type“ karcinomom pre 50. godine. Revidirani Betezda kriterijumi uključuju sledeće: osobe sa kolorektalnim karcinomom pre 50. godine života; prisustvo sinhronih i metahronih kolorektalnih karcinoma ili karcinomi koji su povezani sa hereditarnim nepolipoznim kolorektalnim karcinomom; mikrosatelitski nestabilne kolorektalne karcinome sa izraženom peritumorskom limfocitnom infiltracijom i/ili „Crohn-like“ reakcijom, „signet ring cell“ karcinome, medularne karcinome, mucinozne adenokarcinome; kolorektalni karcinom dijagnostikovani kod jednog ili više članova porodice u prvom kolenu srodstva koji imaju karcinom povezan sa HNPCC-om; kolorektalni karcinom dijagnostikovani kod dva ili više članova porodice u prvom ili drugom kolenu srodstva koji imaju tumore povezane sa hereditarnim nepolipoznim kolorektalnim karcinomom. Jerusalimski kriterijumi su objavljeni 2009. godine. Ovi kriterijumi podrazumevaju određivanje MMR statusa kod pacijenata sa CRC-om koji su mlađi od 70. godina u trenutku postavljanja dijagnoze (Boland CR et al., 2010).

1.5. KLASIFIKACIJA EPITELNIH INVAZIVNIH TUMORA DEBELOG CREVA I REKTUMA

Klasifikacija epitelnih tumora debelog creva i rektuma na osnovu kriterijuma postavljenih od strane Svetske Zdravstvene Organizacije (engl. World Health Organisation, WHO) iz 2018. godine je prikazana u tabeli 1.

Tabela 1. Klasifikacija epitelnih invazivnih tumora debelog creva i rektuma

Adenokarcinoma, NOS
„Low-grade“ (dobro diferentovan i umereno diferentovan)
„High-grade“ (loše diferentovan)
Kribriformni adenokarcinom komedo tipa
Mucinozni karcinom
Medularni karcinom
„Signet ring cell“ karcinom
Seratni adenokarcinom
Mikropapilarni adenokarcinom
Skvamozni karcinom
Adenoskvamozni karcinom
„Small cell“ neuroendokrini karcinom
„Large cell“ neuroendokrini karcinom
Mešoviti neuroendokrini – ne – neuroendokrine neoplazme
Nediferentovani karcinomi

1.6. MORFOLOGIJA KOLOREKTALNOG KARCINOMA I IMUNOHISTOHEMIJSKI OBRAZAC BOJENJA

1.6.1. Makroskopske karakteristike

Distibucija kolorektalnog karcinoma u proksimalnom delu debelog creva je oko 40%, u distalnom delu 22%, u rektumu 30%, a preostalih 8% je lokalizovano na drugim mestima (Siegel RL et al., 2017). Solitarni karcinomi su češći za razliku od multiplih karcinoma. Iako svi karcinomi potiču od „in situ“ lezije, makroskopski izgled kolorektalnih karcinoma može biti različit. Razlikuje se pet tipova kolorektalnih karcinoma na osnovu makroskopskog izgleda (Walsh SV et al., 2019):

- Egzofitični
- Ulcero-infiltrativni
- Stenzirajući
- Difuzni
- Neklasifikovani

Egzofitični rast tumorske mase karakteriše polipoidni ili pečurkasti rast tumorske mase u lumen creva. Obično su desnostrane anatomske lokalizacije, većih dimenzija i mekane konzistencije. Zbog česte anatomske lokalizacije u cekumu i ascendentnom kolonu, veoma retko dovode do opstrukcije celog lumena creva (Slika 3).



Slika 3. Makroskopski izgled egzofitične tumorske mase u donjem delu slike i prikaz polipa na peteljci u gornjem delu slike

Ulceroinfiltrativni rast tumora karakteriše prisustvo egzofitičnog rasta uglavnom pečurkastog izgleda sa centralnom ulceracijom. Ovaj tip rasta tumora je infiltrativnog karaktera. Prisutna je infiltracija čitavog zida kolona ili rektuma tumorskim procesom, sa čestim metastazama u regionalnim limfnim nodusima (Slika 4).



Slika 4. Makroskopski izgled ulcero-infiltrativnog rasta tumora

Stenozirajući rast tumora podrazumeva zahvatanje čitave cirkumferencije zida creva sa posledičnom opstrukcijom lumena i čestim razvojem ileusa. Zid creva je proksimalno od stenoze distendiran i istanjen sa mogućim perforacijama i posledičnim razvojem peritonitisa. Uglavnom su malih dimenzija, a ivice tumora su obično izdignute. Najčešće su levostrane anatomske lokalizacije i čvrste konzistencije zbog izraženog procesa dezmoplazije.

Kod difuznog tipa rasta koji se označava i kao „Linitis plastica“ usled zahvatanja čitavog zida creva tumorskim procesom, crevo poprima izgled „kožnate boce“. Zid creva je zadebljan, smanjene je elastičnosti i rigidan. Tumorska masa je uglavnom čvrste konzistencije zbog izraženog procesa

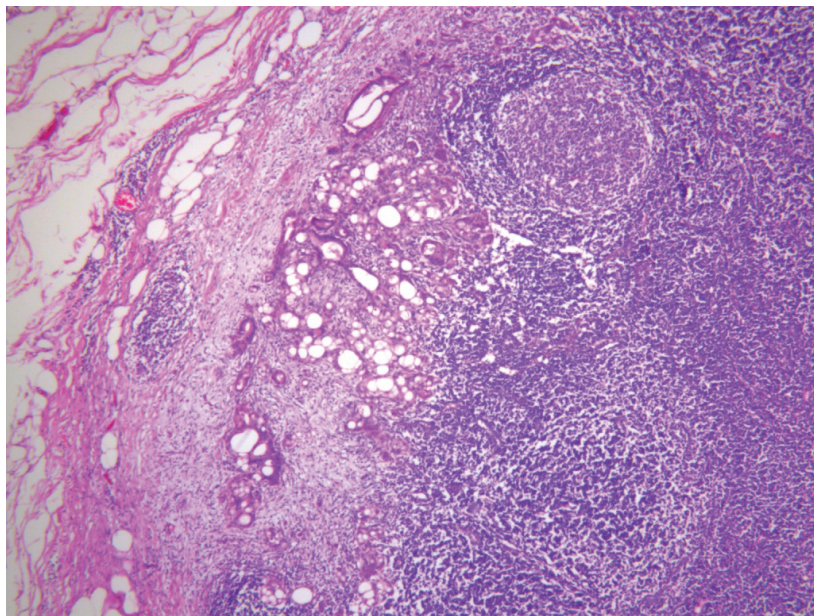
dezmoplazije. Anatomska lokalizacija karcinoma je uglavnom distalna. Opstrukcije i perforacije zida creva zbog anatomske lokalizacije tumorskog procesa se uglavnom ne javljaju (Slika 5).



Slika 5. Difuzni tip rasta kolorektalnog karcinoma,
makroskopski izgled karcinoma

Bez obzira na makroskopski izgled tumora, karcinomi u kasnim fazama vrše infiltraciju celog zida debelog creva ili rektuma, šire se u regionalne peritumorske i mezenterične limfne noduse (Slika 6), a zatim daju najčešće hematogene metastaze u jetri. Mogu biti prisutni i multipli depoziti po peritoneumu. Ređe daju sekundarne depozite u plućima, kostima i mozgu. Prisustvo peritonealnih

metastaza predstavlja loš prognostički faktor, gde je opšta stopa preživljavanja kraća u odnosu na tumore bez prisustva peritonealnih metastaza (Shepherd N et al 1997; Tong GJ et al., 2018).



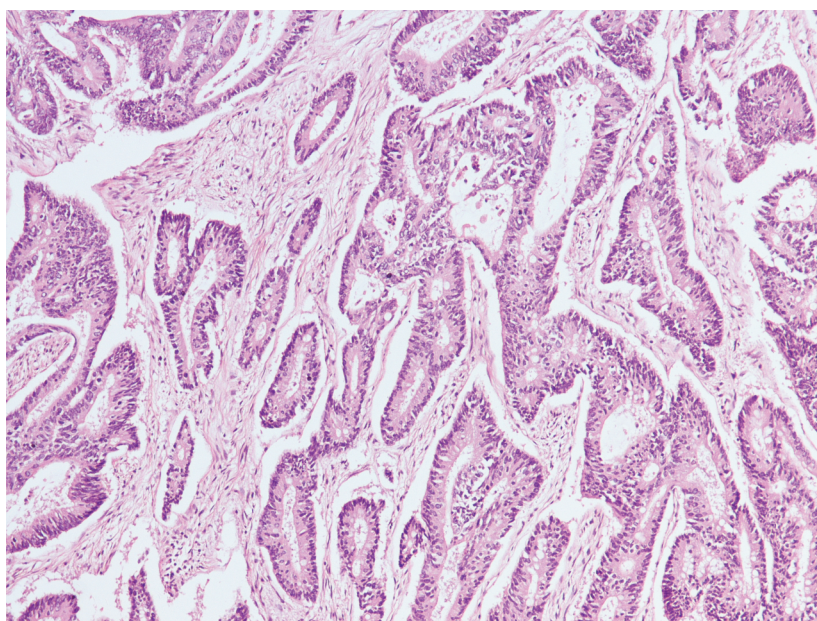
Slika 6. Histopatološki prikaz prisustva neoplastičnih žlezdanih formacija karcinoma kolona u limfnom nodusu subkapsularne lokalizacije, HE x100

1.6.2. Mikromorfološke karakteristike

Na osnovu klasifikacije predložene od strane WHO, histološke varijante kolorektalnog karcinoma su: konvencionalni adenokarcinom, „cribriform comedo type” adenokarcinom, mucinozni adenokarcinom, medularni adenokarcinom, mikropapilarni adenokarcinom, „signet ring cell” karcinom, „serrated” adenokarcinom, adenoskvamozni karcinom, skvamozni i nediferentovani. Ovde se razmatraju samo adenokarcinomi kao histološke varijante kolorektalnog karcinoma.

Konvencionalni adenokarcinom čini 75-80% svih kolorektalnih karcinoma, poznat kao NST adenokarcinoma (engl. No special type) ili NOS (engl. Not otherwise specified). Mikromorfološki je izgrađen od glandularnih struktura nepravilnog izgleda koje su obložene atipičnim pleomorfim tumorskim ćelijama. U lumenu glandularnih formacija je često prisutan eozinofilni sadržaj sastavljen od sluzi i ćelijskog detritusa, označen kao prljava nekroza „dirty necrosis”. Citoplazma tumorskih ćelija je eozinofilna sa čestim intracelularnim vakuolama, dok je ćelijska membrana jasno uočljiva. Jedra su pseudostratifikovana, uvećana, hiperhromna ili vezikularna sa uočljivim jedarcetom, dok je jedarna membrana jasno vidljiva. Mitoze su prisutne, a patološke mitotske

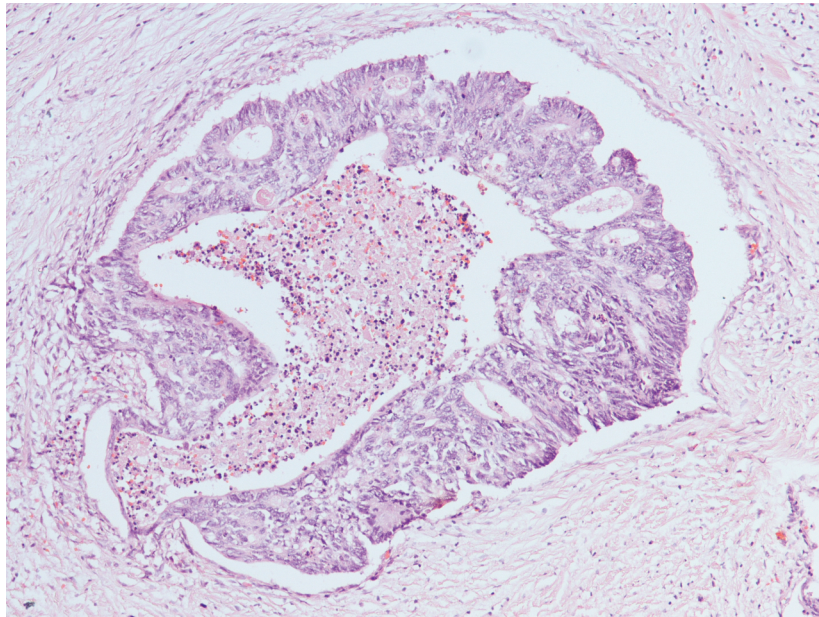
figure su relativno prisutne. Više od 70% kolorektalnih karcinoma je „low grade“, a sistem za histološko gradiranje tumora je zasnovan na procentualnoj zastupljenosti glandularnih struktura u tumorskom tkivu (Walsh SV et al., 2019). Kod „low grade“ konvencionalnog adenokarcinoma dominiraju cilindrične tumorske ćelije, dok se kod „high grade“ adenokarcinoma smanjuje procenat prisustva cilindričnih, a povećava se broj kubičnih i poligonalnih ćelija (Slika 7). Osim ovih tumorskih ćelija, u sklopu konvencionalnog adenokarcinoma mogu biti prisutne i druge ćelijske populacije: skvamozne ćelije, Panetove ćelije kao i neuroendokrine ćelije (Walsh SV et al., 2019). Stroma tumora može biti različita, od veoma oskudne vezivno-tkivne strome do intenzivne dez-moplastične stromalne reakcije. Peritumorska limfocitna infiltracija od strane domaćina može biti: odsutna, slaba i veoma izražena. „Crohn-like“ reakcija može biti prisutna u okolini tumora koja podrazumeva prisustvo najmanje dva limfna folikula sa jasno uočljivim germinativnim centrima. Ovo je čest patohistološki nalaz kod kolorektalnih karcinoma sa deficitarnim MMR statusom (dMMR) (Peltomaki P, 2005). Limfociti se osim u stromi mogu videti i u parenhimu tumora kada se označavaju kao tumor infiltrišući limfociti (TIL), češće prisutni kod mikrosatelitski nestabilnih tj. deficitarnih MMR tumora (Lynch HT et al., 2015).



Slika 7. Patohistološki prikaz dobro diferentovanog konvencionalnog adenokarcinoma, HE x100

Usled proliferacije tumorskih ćelija koje oblažu nepravilne glandularne formacije i njihovog premošćavanja, može doći do stvaranja sekundarnih lumenova i formiranja kribriformnih struktura (Slika 8). U centralnom delu ovih kribriformnih struktura prisutna su nekrotična područja. Ovakav

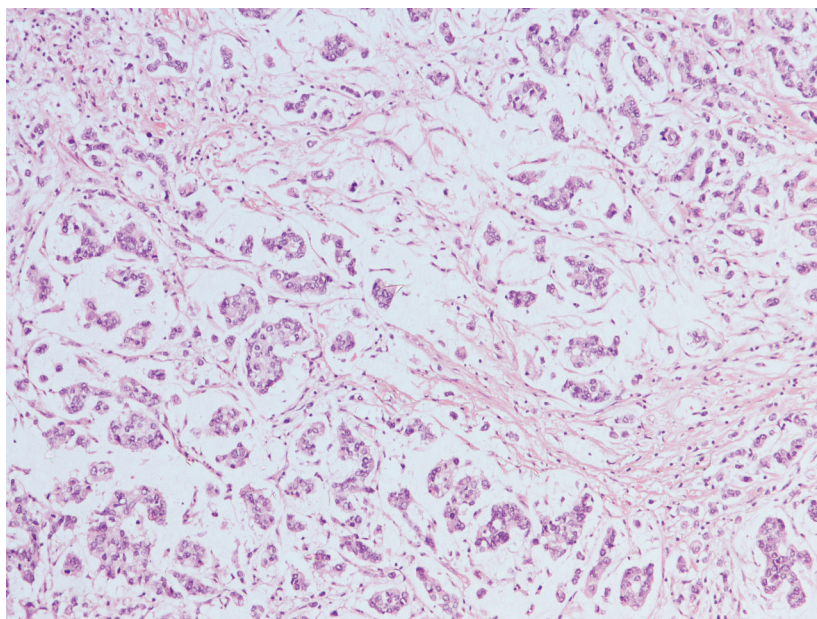
mikromorfološki izgled karcinoma je označen kao „cribriforme-comedo type” adenokarcinom (Walsh SV et al., 2019). Ovaj histološki tip adenokarcinoma se retko javlja, u oko 7.3% slučajeva. Češće se javlja kod starijih osoba muškog pola. Predilekciono mesto ne postoji, a anatomska zastupljenost levostrano i desnostrano je jednaka. Molekularni profil karakteriše aberantna metilacija CpG sekvenci, i uglavnom je mikrosatelitski stabilan odnosno ekspresija MMR proteina je proficijentna (Chirieac LR et al., 2005). Dijagnostikuje se najčešće u III I IV stadijumu bolesti, uglavnom sa prisustvom limfovaskularne invazije i metastazama u peritumorskim regionalnim limfnim nodusima kao i sekundarnim depozitima u udaljenim organima (Lino-Silva LS et al., 2015; Branca G et al., 2017).



Slika 8. Patohistološki prikaz adenokarcinoma „cribriforme-comedo type”, HE x100

Mucinozni adenokarcinom predstavlja poseban podtip adenokarcinoma koga karakteriše prisustvo ekstracelularnih mucina u više od 50% tumorske mase (Slika 9). Tumori sa mucinoznom sekrecijom u više od 10% celokupne tumorske mase, a manje od 50% su označeni kao adenokarcinomi sa mucinoznim karakteristikama ili adenokarcinomi sa mucinoznom diferencijacijom (Walsh SV et al., 2019). Simptomi se ne razlikuju od onih kod konvencionalnog CRC, ali se mucinozni karcinom često otkriva u uznapredovalom stadijumu bolesti. Uglavnom su velikih dimenzija i povezani su sa čestim metastazama u regionalnim limfnim čvorovima i multiplim peritonealnim depozitima. Javljaju se učestalije kod pacijenata mlađih od 50. godina, kod osoba ženskog pola i češće su lokalizovani u cekumu, ascendentnom i transverzalnom kolonu. Tumorske ćelije su

eozinofilne citoplazme sa intracelularnim vakuolama, koje formiraju acinarne strukture. Prisutne su i diskohezivne tumorske ćelije koje plivaju u ekstracelularnim mucinima, kao i tumorske ćelije sa intracelularnim mucinima koje se označavaju kao „signet ring” ćelije. Mucini su histochemijski PAS pozitivni i Alcian pozitivni. Mnogi mucinozni karcinomi pokazuju deficit MMR statusa. Mikromorfološki se kod ovog tipa karcinoma primećuje i povećan broj tumor infiltrišućih limfocita, kao i „Crohn-like” reakcija naročito u karcinomu koji pokazuje deficit MMR-a. Mucinozni karcinom ima veću učestalost mutacija KRAS u oko 65% slučajeva, u poređenju sa drugim histološkim tipovima. Kod ovih karcinoma je često prisutna i mutacija BRAF onkogen (Green JB et al., 1993; Hugen N et al., 2014).



Slika 9. Patohistološki prikaz mucinoznog adenokarcinoma, HE x100

„Signet ring cell” karcinomi se retko javljaju u debelom crevu i rektumu i čine manje od 1% svih CRC-a (Laufman H and Saphir O, 1951). Sastoje se od diskohezivnih tumorskih ćelija koje sadrže intracelularne mucine u vidu vakuole koja potiskuje citoplazmu i jedro u vidu polumeseca na periferiju ćelije, dajući izgled ćeliji prstena pečatnjaka. Adenokarcinomi sa prisustvom manje od 50% „signet ring” ćelija definisani su kao adenokarcinomi sa „signet ring cell” komponentom. (Walsh SV et al., 2019). Ovi karcinomi imaju lošu prognozu kao i na drugim lokalizacijama (Nitsche U et al., 2013). Dijagnostikuju se najčešće u uznapredovalom patološkom stadijumu sa metastazama u regionalnim limfnim nodusima i multiplim peritonealnim metastazama, kao i sekundarnim depozitima u udaljenim organima. Češće su desnostrane anatomske lokalizacije i najčešće se javljaju kod pacijenata ženskog pola. U poređenju sa konvencionalnim adenokarcinomom, ovaj tip carcinoma

se češće javlja kod mlađih osoba, uglavnom između 50. i 60. godine života (Tajiri K et al., 2017). „Signet ring cell” karcinomi dele molekularne karakteristike sa mucinoznim adenokarcinomima. Nađena je visoka učestalost mutacija KRAS i BRAF onkogeni kod ovih karcinoma u poređenju sa konvencionalnim adenokarcinomom (Wei Q et al., 2016). Dijagnoza se postavlja ukoliko je u više od 50% tumorske mase prisutno „signet ring” ćelija. Razlikuju se dva molekularna fenotipa ovog karcinoma i to hipermetilacioni MSI karcinom levostrane lokalizacije i hipometilacioni MSS karcinom desnostrane anatomske lokalizacije. Ukoliko su mikrosatelitski nestabilni imaju bolju opštu stopu preživljavanja u odnosu na mikrosatelitski stabilne karcinome debelog creva. (Alvi MA et al., 2017).

Seratni adenokarcinomi nastaju na terenu sesilnih seratnih nazubljenih adenoma koje karakteriše prisustvo mutacije V600E BRAF onkogeni (Stefanius K et al., 2011). Javljaju kod pacijenata između 60. i 70. godine života. Najčešće su lokalizovani desnostrano. Mikromorfološka arhitektura je slična sesilnom seratnom adenoma. Prisutne su neoplastične glandularne formacije testerastog, nazubljenog, seratnog izgleda koje nastaju usled neravnomerne proliferacije tumorskih ćelija. Mogu biti prisutni i taftovi odnosno čuperci bez poremećaja polariteta ćelija kao što je to kod mikropapilarnog adenokarcinoma. Citoplazma tumorskih ćelija je obilna i hipereozinofilna, a jedra su vezikularna sa jasno uočljivim jedarcima i bazalno su postavljena. Nekroze su uglavnom odsutne ili ih je <10% od celokupnog volumena tumorske mase (García-Solano J et al., 2010; Tuppurainen K et al., 2005). Garcia-Solano i saradnici su došli do zaključka da pacijenti sa ovim tumorom češće daju metastaze u regionalnim peritumorski limfnim čvorovima i imaju lošiju prognozu u poređenju sa konvencionalnim CRC-om, naročito u slučaju levostrane anatomske lokalizacije tumora (García-Solano J et al., 2011). Pored toga, sesilne seratne adenokarcinome karakteriše „high grade” tumorsko pupljenje i slaba limfocitna infiltracija u okolini tumorske mase. Zanimljivo je da je Zhu sa saradnicima pokazao značajnu povezanost jake ekspresije PD-L1 kod sesilnih seratnih karcinoma i njihovu povezanost sa lošim preživljavanjem (Zhu H et al., 2015). Predložili su i imunohistohemijske markere u cilju postavljanja dijagnoze ovog karcinoma. Među najrelevantnijim različito ekspimiranim biomarkerima u seratnom karcinomu su sledeći markeri: hipoksijom indukovani faktor 1-alfa (HIF-1a), fascin 1, anti-apoptički gen hipokalcin i aneksin A10 (Zhu H et al 2015).

Medularni adenokarcinomi se veoma retko javljaju, 5-8 slučajeva na 10.000 dijagnostikovanih kolorektalnih karcinoma, sa srednjom godišnjom incidencom 3.47 na 10 miliona stanovništva (Thirunavukarasu P et al., 2010). Češće su lokalizovani desnostrano, mikrosatelitski su češće nestabilni i imaju bolju opštu stopu preživljavanja u odnosu na konvencionalni adenokarcinom. Pored toga, medularni karcinomi često pokazuju hipermetilaciju MLH1 promotora i mutaciju BRAF V600E onkogeni. Suprotno tome, mutacije TP53 i KRAS se javljaju mnogo ređe kod medularnih karcinoma nego kod konvencionalnih (Lanza G et al., 1999; Pyo JS et al., 2016; Lee LH et al., 2017). Medularni karcinomi imaju povoljniji klinički ishod u odnosu na konvencionalne adenokarcinome.

Mikromorfološki su prisutne solidne plaže poligonalnih tumorskih ćelija obilne eozinofilne citoplazme, velikih vezikularnih jedara sa prominentnim nukleolusom, nejasnih međućelijskih granica što daje izgled sincicijalnog rasta samoj tumorskoj masi. U okolini tumorskih plaža je prisutan gust limfocitni infiltrat kao i brojni limfociti u tumorskom parenhimu (Walsh SV et al., 2019).

Mikropapilarni adenokarcinom je retka varijanta kolorektalnog karcinoma i ima lošiju prognozu u odnosu na konvencionalni adenokarcinom. Kod većine bolesnika sa ovim karcinomom u vreme postavljanja dijagnoze postoje regionalne i/ili udaljene metastaze (Jakubowska K et al., 2016). Češće se javlja kod mlađih osoba sa desnostranom anatomskom lokalizacijom tumora, a najčešće je lokalizovan u cekumu i rektumu (Ueno H et al., 2012; Guzińska-Ustymowicz K, 2014). Mikromorfološki prisutni su klasteri ovalnih ili okruglih tumorskih ćelija bez fibrovaskularne strome, oko kojih se nalazi optički prazan prostor koji ih deli od okolne vezivno- tkivne strome. Prisutna je obrnuta jedarna polarizacija ćelija. Jedra tumorskih ćelija su orijentisana prema sredini ćelijske nakupine, što omogućuje pravu histopatološku dijagnozu karcinoma. Imunohistohemijski je prisutno MUC1 pozitivno bojenje. Interesantno je da tumorske ćelije ekspimiraju i mezenhimalne markere. Prisutna je povećana ekspresija vimentina što ukazuje na epitelno-mezenhimnu tranziciju karcinoma. Nastaje kao posledica hromozomske nestabilnosti usled mutacija TP53, KRAS i BRAF, dok se mikrosatelitska nestabilnost veoma retko javlja kod ovog tipa karcinoma (Kuroda N et al., 2007).

1.6.3. Imunohistohemijski obrazac kolorektalnog karcinoma

Od praktičnog značaja za dijagnostiku najčešće korišćeni imunohistohemijski (Engl. Immunohistochemical, IHC) markeri za dokazivanje kolorektalnih adenokarcinoma su citokeratini (CK), CDX2, SATB2 i vilin. Najčešći imunofenotip kolorektalnog adenokarcinoma je citoplazmatska pozitivnost na CK20 (registovana pozitivnost tumorskih ćelija kod kolorektalnog karcinoma je oko 89%) i negativnost na CK7 (13% tumorskih ćelija je pozitivno), što je relativno specifičan obrazac bojenja za kolorektalno poreklo. Međutim, do 20% tumora može pokazati sledeći imunohistohemijski obrazac bojenja: CK7-pozitivno/CK20-negativno ili CK7-negativno/CK20-negativno (Walsh SV et al., 2019). Visoki nivoi ekspresije CK20 i nizak nivo CK7 ekspresije su povezani sa dobrom diferencijacijom tumora. Sa druge strane, kod loše diferentovanih tumora i MMR deficitarnih odnosno MSI tumora, pronađeni su visoki nivoi ekspresije CK7 i niski nivoi ekspresije CK20 (Harbaum L et al., 2012). Otkriveno je da MSI kolorektalni karcinomi sa BRAF mutacijom, podtipom koji je agresivan i ima lošu prognozu, pokazuju povećanu ekspresiju CK7 markera (Landau MS et al., 2014). CDX2 je marker enteričke diferencijacije i pozitivan je u više od 90% kolorektalnih adenokarcinoma. Međutim, nuklearna ekspresija CDX2 markera može biti pozitivana u bilo kojem karcinomu koji pokazuje enteričku diferencijaciju i stoga nije u potpunosti kolorektalnog porekla. Landau i saradnici su u svojoj studiji otkrili da je gubitak ekspresije ovog markera povezan sa lošijim preživljavanjem pacijenata sa kolorektalnim karcinomom (Landau

MS et al., 2016). Zlobec i Dawson su u svojim istraživanjima otkrili da je gubitak ekspresije CDX2 proteina u kolorektalnom karcinomu povezan sa MSI tumorima (Zlobec I et al., 2011; Dawson H et al., 2013). Kolorektalni karcinomi u više od 90% slučajeva pokazuju pozitivnost na vilin. Gubitak ekspresije vilina je povezan sa loše diferentovanim i MSI karcinomima (Arango D et al., 2012). Al-Maghrabi i saradnici su otkrili povezanost gubitka ekspresije vilina sa „high grade“ karcinomima i lošim preživljavanjem kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom (Al-Maghrabi J et al., 2013). Citoplazmatska i membranska ekspresija CEA-M proteina je prisutna u više od 95% tumora debelog creva i rektuma. Što se mucina tiče, u sklopu kolorektalne karcinogeneze analizirano je više mucina i tipičan profil je MUC2+/MUC5AC-. Međutim, podaci o prediktivnom i prognostičkom značaju ekspresije mucina su ograničeni i kontradiktorni (Bu X-D et al., 2010; Byrd JC et al., 2004).

1.7. PATOLOŠKI PROGNOŠTIČKI FAKTORI

Određivanje patološkog stadijuma bolesti je „zlatni standard“, u prognostičkom smislu i predstavlja esencijalni prediktivni faktor kolorektalnog karcinoma. Međutim, pacijenti u istom stadijumu bolesti ispoljavaju značajne razlike u kliničkom ishodu. Pored patološkog stadijuma postoje i drugi značajni prognostički faktori. Tu se ubrajaju sledeći: rezidualni status tumora, status cirkumferentne resekcione margine, stepen diferencijacije tumora, tumorsko pupljenje, limfocitni odgovor od strane domaćina, limfovaskularna invazija i perineuralno širenje.

1.7.1. Patološki stadijum bolesti

Nakon više decenija primene Djuksove klasifikacije (Dukes, 1932. godina), počela je da se primenjuje i Astler-Kolerova klasifikacija (Astler-Coller, 1954.godina). Ova klasifikacija je zasnovana na Djuksovoj klasifikaciji. Sama klasifikacija je detaljnija, a oznake stadijuma su alfanumeričke (Dukes CE, 1931; Astler VB and Coller FA, 1954).

1) Dukes-ova klasifikacija:

- A – tumorski proces infiltrira zid creva do mišićnog sloja, bez prisustva metastaza u regionalnim limfnim nodusima;
- B – tumorski proces infiltruje čitav zid creva, bez prisustva metastaza u regionalnim limfnim nodusima;
- C – prisutne su metastaze u regionalnim limfnim nodusima;
- D – prisutne su udaljene metastaze;

2) Astler-Coller-ova klasifikacija:

B stadijum je klasifikovan na B1 stadijum ukoliko je prisutna infiltracija mišićnog sloja tumorskim procesom i na B2 stadijum ukoliko tumorski proces probija mišićni sloj.

C stadijum je klasifikovan na C1 stadijum ukoliko tumorski proces infiltruje mišićni sloj zida creva i ako su prisutne metastaze u regionalnim limfnim nodusima i na C2 stadijum ukoliko tumorski proces probija mišićni sloj i ako su prisutne metastaze u regionalnim peritumorskim limfnim nodusima.

Tabela 2. Astler-Coller-ova klasifikacija stadijuma kolorektalnog karcinoma

Stadijum	Karakteristike
A	Tumorski proces infiltrira sluznicu i podsluznicu
B1	Tumorski proces infiltrira mišićni sloj ali bez proboja i bez prisustva nodalnih metastaza
B2	Tumorski proces probija mišićni sloj, bez prisustva nodalnih metastaza
C1	Tumorski proces infiltrira mišićni sloj ali bez proboja, sa prisutnim nodalnim metastazama
C2	Tumorski proces probija mišićni sloj, sa prisutnim nodalnim metastazama
D	Tumorski proces je prisutan u udaljenim organima i strukturama

U savremenoj praksi (Tong GJ et al., 2018), u najširoj primeni je TNM klasifikacija (T-dubina invazije tumora, N- zahvaćenost limfnih nodusa, M-prisustvo metastaza), preporučena od strane Američkog združenog komiteta za rak (engl. American Joint Committee on Cancer, AJCC) iz 2018. godine i od strane Svetske zdravstvene organizacije.

1. Dubina invazije tumora (T)

- TX Primarni tumorski proces nije moguće odrediti
- T0 Bez prisustva primarnog tumora
- Tis Intraepitelna lezija bez proboja bazalne membrane
- T1 Tumorski proces je lokalizovan u submukozi
- T2 Tumorski proces infiltrira mišićni sloj zida creva
- T3 Tumorski proces infiltrira mišićni sloj zida creva i širi se u okolno perikolično masno tkivo
- T4a Tumorski proces zahvata visceralni peritoneum
- T4b Tumorski proces infiltrira okolne strukture i organe

2. Zahvaćenost regionalnih limfnih nodusa (N)

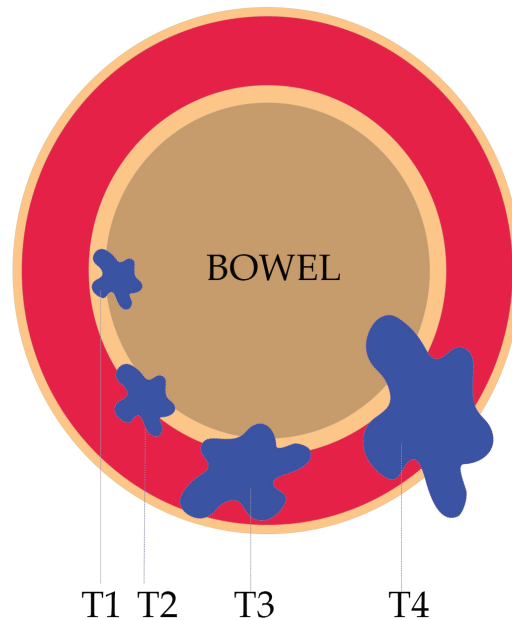
- NX Metastaze u regionalnim limfnim nodusima nije moguće odrediti
- N0 Bez prisustva metastaza u regionalnim limfnim nodusima
- N1 Prisustvo metastaza u 1-3 peritumorska limfna nodusa
- N1a Prisustvo metastaze u jednom regionalnom limfnom nodusu
- N1b Prisustvo metastaze u 2-3 regionalna limfna nodusa
- N1c Prisustvo tumorskih depozita-„satelita“ nejasnih kontura u subserozi, mezen-terijumu, ili u neperitonealizovanom perikoličnom masnom tkivu, bez prisustva metastaza u regionalnim limfnim nodusima
- N2 Metastaze u 4 ili više regionalnih limfnih nodusa
- N2a Metastaze u 4-6 regionalnih limfnih nodusa
- N2b Metastaze u 7 ili više regionalnih limfnih nodusa

3. Udaljene metastaze (M)

- MX Nije moguće odrediti prisustvo udaljenih metastaza
- M0 Bez prisustva metastaza u udaljenim organima ili strukturama
- M1 Metastaze u udaljenim organima
- M1a Prisustvo metastaze u jednom udaljenom organu
- M1b Prisustvo metastaze u više udaljenih organa ili struktura
- M1c Prisustvo peritonealnih metastaza

Za identifikaciju specijalnih slučajeva u TNM klasifikaciji koriste se prefiksi m, y, r. T(m) označava prisustvo multiplih primarnih tumora. T(y) predstavlja procenu tumora nakon primene terapije,

dok T(r) označava prisustvo rekurentnog tumora. Tis predstavlja „in situ“ karcinome odnosno intramukozne karcinome koji zahvataju laminu propriju i muskularis mukoze ali bez zahvatanja submukoze. Dubinu invazije tumora (Slika 10) definiše T stadijum koji se povećava od T1 (invazija submukoze) do T4 (invazija u serosu ili susedne strukture).



Slika 10. Dubina invazije tumora, šematski prikaz

Kako se dubina invazije tumora povećava, raste i rizik za prisustvo metastaza u regionalnim limfnim nodusima i u udaljenim organima. Histopatološki pregled okolnih peritumorskih limfnih nodusa definiše N stadijum: N0 (bez prisustva tumorskog procesa u limfnim čvorovima), N1 (zahvaćenost 1-3 limfna čvora tumorom) i N2 (zahvaćenost više od tri limfna čvora tumorom).

Postojeće smernice preporučuju identifikaciju 12 ili više limfnih čvorova u resekovanom materijalu, budući da je ispitivanje manjeg broja regionalnih limfnih nodusa povezano sa lošijim ishodom bolesti. Pregled manjeg broja limfnih nodusa može uticati na postoperativni ishod bolesti u smislu izostavljanja korisne adjuvantne hemioterapije. Ukupan broj izolovanih limfnih nodusa zavisi od različitih faktora. Studije su pokazale pozitivnu povezanost sa većom dužinom odnosno veličinom uzorka, širinom perikolorektalnog masnog tkiva, ženskim polom i veličinom tumora. Sa druge strane, studije su pokazale negativnu povezanost sa starošću pacijenta i rektosigmoidnom lokacijom tumora. Ukoliko su pacijenti primili preoperativnu neoadjuvantnu terapiju moguće je očekivati manje od 12 peritumorskih limfnih čvorova. Jedan od problema u stadiranju limfnih čvorova je i interpretacija sekundarnih depozita u perikolorektalnom masnom tkivu.

U priručniku AJCC iz petog izdanja (Fleming ID et al., 1997) na osnovu veličine tumorskih čvorova je izvršena klasifikacija. Ukoliko je tumorski čvor > 3 mm klasifikovan je kao pozitivan čvor, dok je tumorski čvor ≤ 3 mm klasifikovan kao tumorski depozit (T3).

U šestom izdanju tumorski depoziti su klasifikovani u T kategoriju, kao i venske invazije sa ekstravaskularnim širenjem ukoliko su nepravilnog oblika i ako su odvojeni od primarne tumorske mase. Tumorski depoziti su smatrani pozitivnim čvorovima ukoliko su u potpunosti odvojeni od primarne tumorske mase, okruglog izgleda i glatkih kontura, bez obzira na veličinu (Greene FL et al., 2002).

Sedmo izdanje (Edge SB et al., 2010) prepoznaje činjenicu da tumorski depoziti mogu predstavljati diskontinualno širenje tumorskog procesa, vensku invaziju sa ekstravaskularnim širenjem ili u potpunosti mogu zameniti limfne čvorove. S obzirom na njihovu povezanost sa smanjenom opštom stopom preživljavanja, tumorski depoziti se sada smatraju nodalnim metastazama, bez obzira na veličinu ili konturu, i označeni su kao N1c ukoliko nema metastaza u regionalnim limfnim nodusima. Međutim, ako je identifikovan samo jedan pozitivan limfni čvor, N stadijum će biti promenjen iz N1c u N1a.

Osmo revidirano izdanje (Tong GJ et al., 2018) uključuje novi stadijum IVC koji podrazumeva prisustvo peritonealnih metastaza. Tumorske depozite, limfovaskularnu invaziju, MMR status i BRAF status izdvaja kao značajne prognostičke faktore.

Prognostički značaj izolovanih ćelija tumora (engl. Isolated Tumor Cell, ITC), definisanih kao pojedinačne tumorske ćelije ili klasteri tumorskih ćelija ≤ 0.2 mm, otkrivenih bilo imunohistohe-mijskim bojenjem ili standardnim hematoksilin-eozin bojenjem u regionalnim limfnim čvorovima, trenutno ostaje nerazjašnjen. ITC su klasifikovane kao N0, ali su označene kao N0i gde „i“ označava „izolovane tumorske ćelije“. Sa druge strane, prisustvo mikrometastaza u regionalnom limfnom nodusu ($> 0,2$ mm, ali ≤ 2.0 mm) se označava kao N1mi. Takođe treba navesti broj limfnih čvorova koji su uključeni u ITC ili mikrometastaze (Tong GJ et al., 2018).

Širenje tumora izvan kolorektuma i regionalnih limfnih čvorova definiše M stadijum, pri čemu M1 označava prisustvo metastaza odnosno sekundarnih depozita na udaljenim mestima. Oko 30% do 40% pacijenata sa lokalizovanom bolešću na kraju razviju metastaze. Jetra je najčešće mesto hematogenih metastaza. Sekundarni depoziti mogu biti prisutni i u drugim organima uključujući pluća, peritoneum, intra-abdominalne limfne čvorove, mozak i kosti. Prisustvo peritonealnih metastaza predstavlja loš prognostički faktor, gde je opšta stopa preživljavanja kraća u odnosu na tumore bez prisustva peritonealnih metastaza (Shepherd N et al 1997; Tong GJ et al., 2018).

Klinički značaj TNM sistema ogleda se u tome da pomogne u uspostavljanju anatomskog obima bolesti, gde kombinacija sva tri parametra omogućava definisanje sveukupnog stadijuma tumora (Tabela 3). Ova klasifikacija stadijuma je jednostavna i označena je od stadijuma I do IV (Tong GJ et al., 2018). Stadijum 0 se koristi za označavanje karcinoma „in situ“.

- Stadijum 0 - „In situ“ karcinom. Tis, N0, M0.
- Stadijum I - Lokalizovan karcinom. T1-T2, N0, M0.
- Stadijum II - Lokalno uznapredovali karcinom, rani stadijum. T2-T4, N0, M0.
- Stadijum III - Lokalno uznapredovali karcinom, kasni stadijum. T1-T4, N1-N3, M0.
- Stadijum IV - Metastatski karcinom. T1-T4, N1-N3, M1.

Tabela 3. Patološki stadijum kolorektalnog karcinoma

Patološki stadijum	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1,T2	N0	M0
II	T3,T4	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
III	Bilo koji T	N1,N2	M0
IIIA	T1,T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T3,T4a	N1	M0
	T2,T3	N2a	M0
	T1,T2	N2b	M0
IIIC	T4a	N2a	M0
	T3,T4a	N2b	M0
	T4b	N1,N2	M0
IVA	Bilo koji T	Bilo koji N	M1a
IVB	Bilo koji T	Bilo koji N	M1b
IVC	Bilo koji T	Bilo koji N	M1c

U vreme postavljanja dijagnoze pacijenti imaju oko 97% verovatnoće za petogodišnje preživljavanje u stadijumu bolesti I. U stadijumima II, III i IV verovatnoća progresivno opada na 78%, 64%, odnosno 11%. Zahvaljujući velikom napretku u primeni imunoterapije, hemioterapije, radioterapije i hirurgije bolesnicima se produžava period bez relapsa, a kod izvesnog broja bolesnika se postiže i trajna remisija (Tong GJ et al., 2018).

1.7.2. Rezidualni status

Rezidualni status predstavlja važan prognostički faktor za lokalnu kontrolu primarnog tumora i označen je kao R kategorija. Određivanje rezidualnog statusa tumora ima veliki značaj u posttremanskom stadiranju kolorektalnih karcinoma. Na osnovu kliničkog i patohistološkog izveštaja se određuje rezidualni status. Odsustvo rezidualnog tumora je označen kao R0 kategorija. Makroskopski verifikovan rezidualni tumor je označen kao R2 kategorija, dok je mikroskopski nalaz tumorskih ćelija uz resekcione ivice označen kao R1 kategorija. Uprkos opsežnoj kliničkoj proceni rezultata lečenja i pažljivim i detaljnim patohistološkim analizama, u nekim slučajevima se ne može proceniti prisustvo rezidualnog tumora što se označava kao RX kategorija. (Wittekind C et al., 2002).

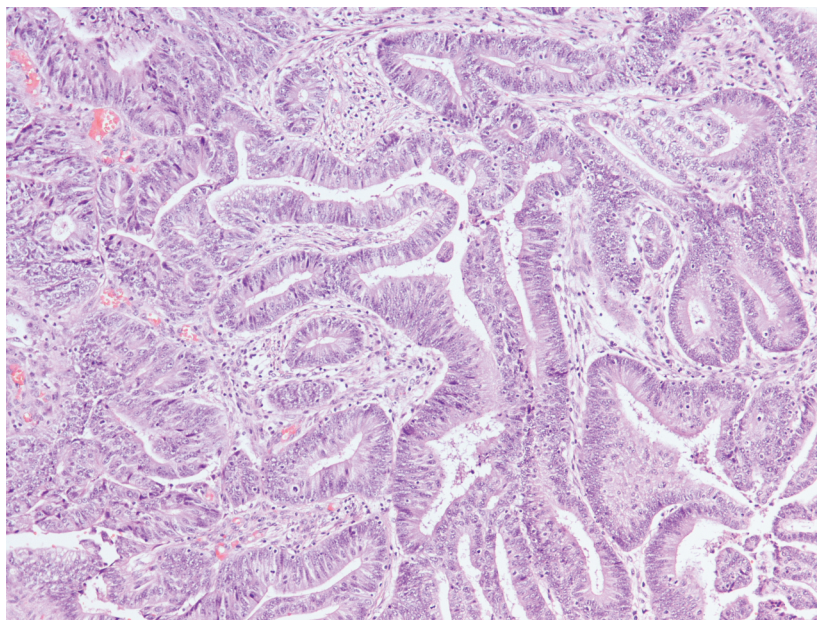
1.7.3. Status cirkumferentne resekcione margine

Prema protokolu od strane CAP, proksimalne i distalne linije resekcije se smatraju adekvatnim ukoliko iznose više od 2 cm za uznapredovale patološke stadijume bolesti, odnosno više od 1 cm za tumore koji se nalaze u stadijumu T1 i T2. Za razliku od proksimalnih i distalnih margina, cirkumferentna resekciona margina predstavlja adventicijalnu marginu. Određuje se merenjem distance u milimetrima između najbližih područja tumorske mase (kontinualnih, diskontinualnih tumorskih depozita, najbliže zahvaćenih limfnih nodusa ili vaskularnih infiltrata) i mezorektalne fascije koja podrazumeva resekcione linije koje se nalaze u njenoj neposrednoj blizini. Ukoliko je distanca tumora od cirkumferentne resekcione margine manja od 1 mm, označava se kao R1 kategorija (pozitivna cirkumferentna resekciona margina) i smatra se lošim prognostičkim faktorom. U tom slučaju recidivi se javljaju u oko 25% slučajeva. Kod R0 kategorije, koja podrazumeva negativnu cirkumferentnu resekcionu marginu, odnosno kada je udaljenost tumora veća od 1mm, recidivi se javljaju u oko 3% slučajeva (Stacchi L et al., 2001; Nagtegaal ID et al., 2002).

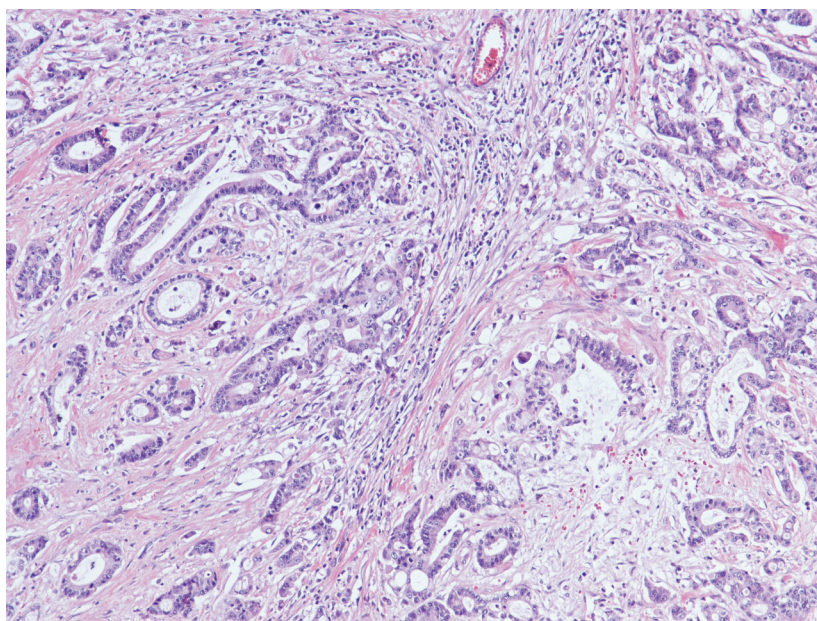
1.7.4. Stepen diferentovanosti

Više od 70% kolorektalnih karcinoma su „low grade“, a sistem za histološko gradiranje tumora je zasnovano na procentualnoj zastupljenosti glandularnih struktura u tumorskom tkivu. Svetska zdravstvena organizacija je predložila dvostepeni sistem histološkog gradiranja za konvencionalne adenokarcinome: „low grade“ za dobro i srednje diferentovane tumore (od 50% do 100% glandularnih formacija) i „high grade“ za loše diferentovane tumore (do 49% žlezdanih formacija). Većina mikrosatelitski nestabilnih kolorektalnih karcinoma su loše diferentovani. Kod „low grade“ konvencionalnog adenokarcinoma dominiraju nepravilne glandularne formacije sa jasno uočljivim lumenovima koje su obložene atipičnim cilindričnim tumorskim ćelijama (Slika 11). Mikromorfološki kod „high grade“ adenokarcinoma se smanjuje procenat prisustva neoplastičnih glandularnih struktura. Neoplastične glandularne strukture obložene su atipičnim pleomorfim

tumorskim ćelijama. Tumorske ćelije su uglavnom kubičnog ili poligonalnog oblika, dok se broj cilindričnih tumorskih ćelija smanjuje (Slika 12). Osim ovih tumorskih ćelija, moguć je i nalaz drugih ćelijskih populacija kao što su: skvamozne ćelije, Panetove ćelije i neuroendokrine ćelije (Hamilton SR et al., 2010; Walsh SV et al 2019).



Slika 11. Mikromorfološki prikaz dobro diferentovanog adenokarcinoma kolona, HE x100



Slika 12. Histopatološki izgled „high grade“ adenokarcinoma, HE x100

1.7.5. Tumorsko pupljenje

Tumorsko pupljenje (engl. Tumor budding, Bd) predstavlja prisustvo pojedinačnih ili manjih grupa tumorskih ćelija, manje od četiri ćelije na invazivnom frontu tumora i ukazuje na biološku agresivnost tumora (Nagtegaal ID et al., 2002; Prall F, 2007). Japanski autor Imai u svom originalnom radu iz 1954. godine pominje tumorsko pupljenje kao mikromorfološki fenomen. Prvo detaljnije opisivanje tumorskog pupljenja, pod nazivom "tumorska dediferencijacija" je objavljeno u radu iz 1985. godine (Gabbert H et al., 1985). Međutim, o prognostičkom značaju tumorskih pupoljaka intenzivnije je počelo da se piše tek nakon 2000. godine (Okuyama T et al., 2003; Guzinska-Ustymowicz K, 2005; Wang LM et al., 2009).

Kod kolorektalnog karcinoma tumorsko pupljenje je prisutno u 20-40% slučajeva i povezano je sa prisustvom limfovaskularne invazije, metastazama u regionalnim limfnim nodusima, udaljenim metastazama i lošom prognozom (Ueno H et al., 2002). Uočeno je da kod dva karcinoma koja se nalaze u istom stadijumu bolesti agresivnije ponašanje ima tumor kod kojeg je prisutno „high grade“ tumorsko pupljenje (Ueno H et al., 2012). Tumorsko pupljenje je dobro poznat nezavisni negativni prognostički faktor kod pacijenata sa CRC-om (Mitrovic B et al., 2012). Identifikacija tumorskog pupljenja u patohistološkom izveštaju može biti potencijalno korisna u procesu donošenja odluka o terapijskom lečenju pacijenata sa CRC-om. Drugo, pacijenti sa CRC-om u stadijumu II sa „high grade“ tumorskim pupljenjem pokazuju lošije preživljavanje bez bolesti od onih koji nemaju tumorsko pupljenje ili imaju nizak stepen Bd. Stoga, tumorski pupoljci visokog stepena mogu biti korisni za skrining pacijenata kojima je potrebna pomoćna hemioterapija (Wang LM et al., 2009).

Pojedinačne tumorske ćelije pokazuju sposobnost da gube epitelna svojstva putem procesa epitelno-mezenhimne tranzicije (EMT) ubikvitarno rasprostranjene u diferencijaciji, zarastanju rana, embriogenezi i karcinogenezi (Zlobec I et al., 2010). Epitelne ćelije gube polaritet transformišući se u mezenhimalni fenotip praćene reprogramiranjem aktinskog citoskeleta i pojačanom pokretljivošću. Proces epitelno-mezenhimne tranzicije uključuje genetske i epigenetske mehanizme. Mikrokruženje tumora ima važnu ulogu u EMT uključujući različite ćelijske i nećelijske komponente, gde interakcija tumorskih ćelija sa okolnim ćelijama i stromom obezbeđuje signale neophodne za preživljavanje. Prva komponenta uključuje vaskularne endotelne ćelije, limfocite, tkivne makrofage, fibroblaste, a druga uključuje komponente ekstracelularnog matriksa, PH, nivo kisenika, različite metaboličke produkte i tome slično (Kalluri R, 2009).

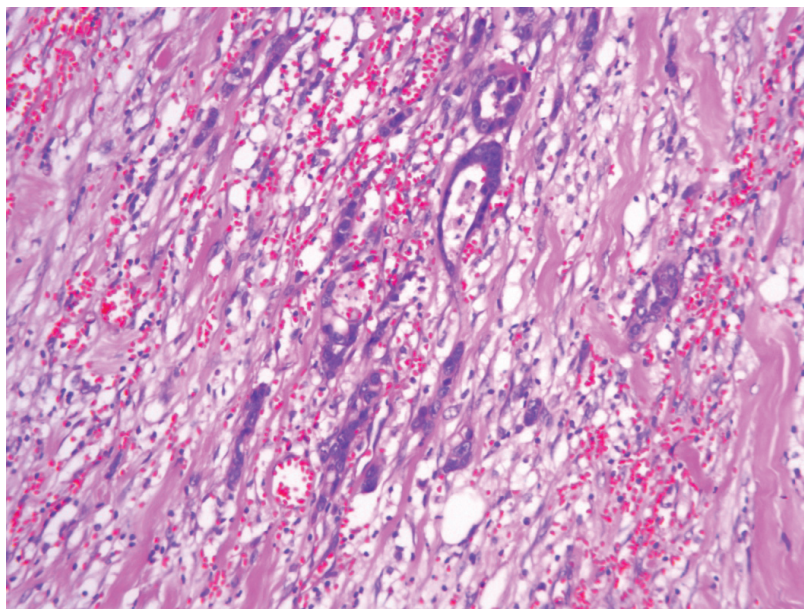
Kvantifikacija tumorskog pupljenja ranije se nije saopštavala u većini patohistoloških izveštaja, te je naknadno određena na osnovu preporuka od strane Internacionalnog Konsenzusa (engl. International Tumor Budding Conference Consensus, ITBCC) (Lugli A et al., 2017). Metoda konsenzusa zahteva skeniranje celog invazivnog fronta tumora na rutinski obojenim HE preparatima

na povećanju x100 i identifikaciju polja sa najvećim brojem tumorskih pupoljaka. Broj tumorskih pupoljaka se određuje (definisanih kao pojedinačne tumorske ćelije ili klasteri do 4 tumorske ćelije) na uvećanju x200. Obzirom na promene promera polja, primena korekcijskog faktora može biti potrebna da bi se objavio broj tumorskih pupoljaka u ekvivalentu 0,785 /mm² polja. U tu svrhu se može koristiti tabela za konverziju (Tabela 4), kao što je to predloženo od strane ITBCC, sa brojem tumorskih pupoljaka podeljenim sa odgovarajućim „faktorom normalizacije“ da bi se dobio broj pupoljaka tumora u ekvivalentu 0,785 mm² polja.

Tabela 4. Tabela za konverziju. Izvor: CAP 2018.

Eyepiece FN diameter (mm)	Eyeplece FN radius (mm)	Specimen radius (mm)	Specimen area (mm²)	Normalization factor
18	9.0	0.450	0.636	0.810
19	9.5	0.475	0.709	0.903
20	10.0	0.500	0.785	1.000
21	10.5	0.525	0.866	1.103
22	11.0	0.550	0.950	1.210
23	11.5	0.575	1.039	1.323
24	12.0	0.600	1.131	1.440
25	12.5	0.625	1.227	1.563
26	13.0	0.650	1.327	1.690

Rezultat tumorskog pupljenja takođe treba da se prijavi korišćenjem troslojnog sistema ili dvoslojnog sistema. Ovaj sistem je zasnovan na broju tumorskih pupoljaka u polju od 0,785 mm². Mi smo se u ovoj studiji opredelili za dvoslojni sistem („low grade“, 0–9 Bd; „high grade“, 10 ili više Bd)-Slika 13.



Slika 13. „High grade“ tumorsko pupljenje na invazivnom frontu tumorske mase, HE x200

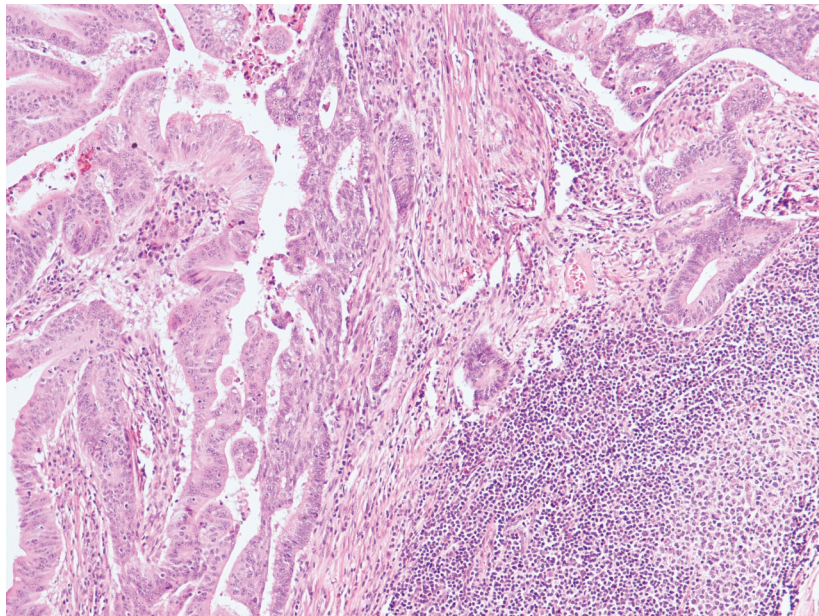
Istraživanja poslednjih godina se bave signalnim putevima TGF- β , WNT, RHO, NF-KB, NOTCH i STAT i putevima faktora rasta, koji igraju regulatornu ulogu u EMT nezavisno ili sinergistički (Gonzalez DM et al., 2014). Ostali faktori transkripcije, kao što su SNAIL, TWIST, SMAD, RAS, porodica ZEB, odgovorni su za aktiviranje puteva povezanih sa EMT. Inflamatorni citokini, kao što su faktor nekroze tumora α (TNF- α) i IL6, takođe mogu indukovati EMT in vitro. Faktor indukovani hipoksijom (HIF-1 α), koji se izlučuje u tumorskom mikrokruženju gde postoji nedostatak kiseonika, može unaprediti razvoj tranzicije. Razvoj EMT je integrisana mreža koja uključuje regulaciju transkripcije i posttranskripcijsku regulaciju (Casas E et al., 2011; Jing Y et al., 2011). Analiza ekspresije pomenutih biomarkera je savremeni princip u istraživanju tumora, te prema tome biomarkeri zbog važne uloge u progresiji tumora bi mogli biti potencijalna meta antikancer-ske terapije (Sounni NE et al 2013).

1.7.6. Imunološki odgovor od strane domaćina

Razvoj tumora je višestepeni proces tumorogeneze u kojem imunološki odgovor igra veoma važnu ulogu. Lokalni imunološki antitumorski odbrambeni mehanizmi određuju razvoj i organizaciju mikrookoline tumora. Limfocitni odgovor od strane domaćina može biti različit, u vidu peritumorske limfocitne infiltracije koja može biti slabo ili jako izražena i koja podrazumeva prisustvo „Crohn-like“ reakcije. Limfocitni odgovor podrazumeva i prisustvo tumor infiltrišućih limfocita (Jass JR et al., 1996).

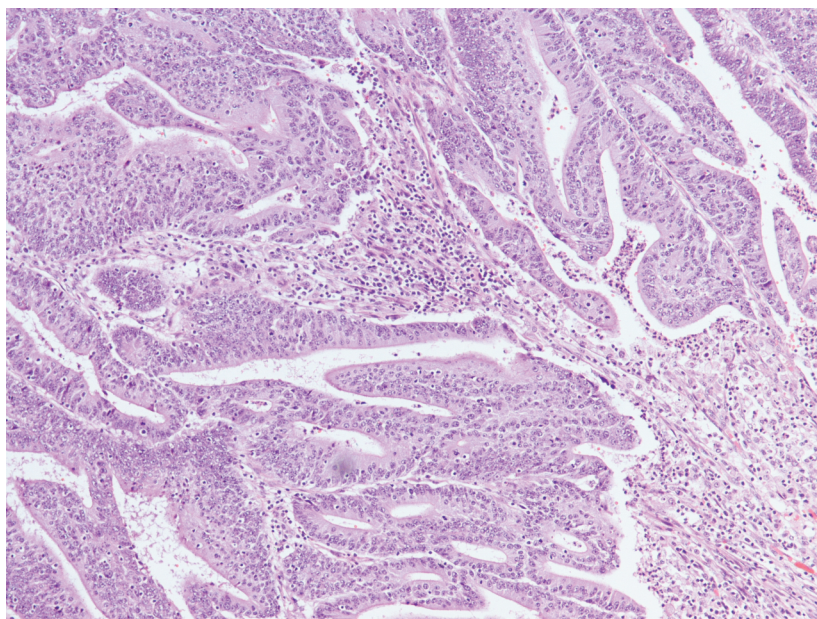
Peritumorska limfocitna infiltracija može biti slabo do umereno prisutna, izražena ili odsutna u okolini tumora. Kod MSI karcinoma odnosno kod karcinoma sa deficitom MMR proteina je često prisutna izražena peritumorska limfocitna infiltracija. (Kim H et al., 1994; Boland C et al., 1998; Raut C et al., 2004; Ogino S et al., 2009).

„Crohn-like“ reakcija podrazumeva izraženu peritumorsku limfocitnu infiltraciju sa prisustvom limfnih folikula, najmanje dva u okolini tumora sa mikromorfološki jasnim germinativnim centrima (Slika 14). Ovo definisanje već pomenute reakcije je preporučeno od strane CAP koja podseća na transmuralnu limfoidnu infiltraciju prisutnu kod pacijenata sa Kronovom bolešću. Većina kolorektalnih karcinoma sa deficitarnim MMR statusom je značajno povezana sa prisustvom „Crohn-like“ reakcije u okolini tumorske mase (Kim H et al., 1994; Boland C et al., 1998; Raut C et al., 2004; Ogino S et al., 2009; Harrison JC et al., 1995).



Slika 14. Mikromorfološki prikaz „Crohn-like“ reakcije u okolini adenokarcinoma debelog creva, HE x100

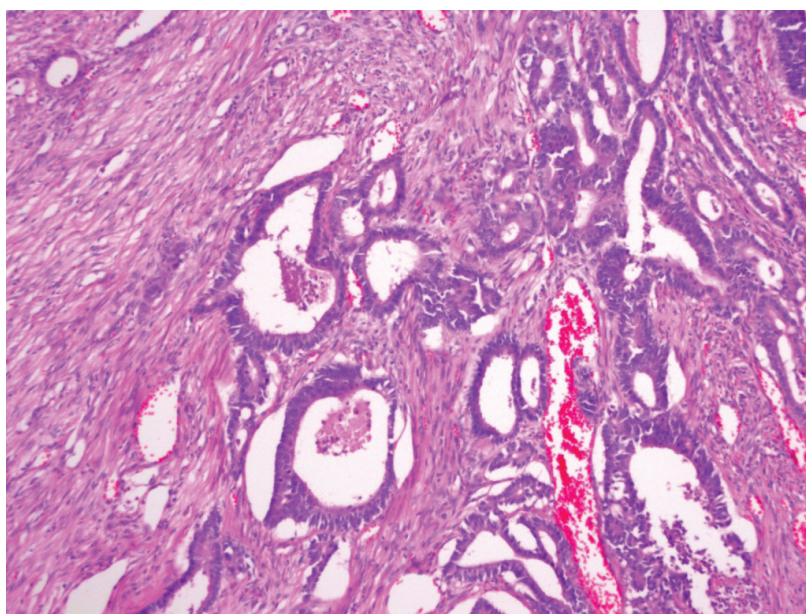
Prisustvo limfocita u tumorskom tkivu, tumor infiltrišući limfociti (TIL) podrazumeva prisustvo limfocita intraepitelno, u tumorskoj stromi i na invazivnom frontu tumora (Slika 15). TIL se smatraju dobrim morfološkim indikatorom deficitarnog MMR statusa. Tumor infiltrišući limfociti prepoznaju tumorske antigene, direktno indukuju lizu tumora ili deluju indirektno oslobađajući specifične hemotaktičke faktore i pro-inflamatorne citokine koji dovode do oštećenja tumorskih ćelija. Koristeći se elektronskom mikroskopijom, primećeno je da kod tumorskih ćelija koje su u direktnom kontaktu sa limfocitima postoje dokazi o razaranju ćelijskih membrana, a u određenim slučajevima su registrovani limfociti koji prodiru u kancerske ćelije uništavajući citoplazmu, jedarnu membranu i ćelijsko jedro (Smyrk TC et al., 2001). Studije pokazuju da pacijenti sa visokom infiltracijom TIL-a mogu imati dobar odgovor na primenjenu ciljanu imunoterapiju. Mnoge studije potvrđuju da su tumor infiltrišući limfociti značajni prognostički faktori kod različitih vrsta maligniteta, uključujući i kolorektalne karcinome (Ropponen KM, et al., 1997; Galon J et al., 2006; . Noshō K et al., 2010). Neke studije su pokazala da je broj TIL-a snažan prognostički faktor, a da je visok broj TIL-a značajno povezan sa boljom prognozom kod pacijenata sa CRC-om. Nekoliko studija je objavilo da broj TIL-a može biti snažni prediktor prognoze pacijenata sa CRC-om, bez obzira na stadijum bolesti i MMR status (Roxburgh CS et al., 2012; Kirilovsky A et al., 2016; Mlecnik B et al., 2016). Kod kolorektalnog karcinoma postignut je impresivan dijagnostički razvoj korišćenjem procene infiltrišućih imunih T ćelija u tkivo karcinoma kako bi se formirao „Immunoscore“ kao bitan i esencijalan dodatak TNM klasifikaciji, označen kao TNM-immunoscore (TNM-I). Svetska radna grupa uključuje veliki broj prospektivnih multicentričnih studija s ciljem primene TNM-I u kliničko donošenje odluka. (Galon J et al., 2014). Slična međunarodna radna grupa procenila je ulogu limfocita koji infiltrišu tumorsku masu (TIL) u karcinomu dojke i nedavno objavila njihove preporuke (Salgado R et al., 2015). Međutim, postoje velike razlike u određivanju imunoscora između kolorektalnog karcinoma i karcinoma dojke. Kod kolorektalnog karcinoma, immunoskor se razlikuje u gustini tumor infiltrišućih limfocita u centralnom delu tumorske mase i na invazivnoj margini tumora, ali odabrana područja za procenu TIL-a (kako u centralnom tumoru tako i na invazivnoj margini) uključuju limfocite i iz intraepitelnog i iz stromalnog kompartmana. Preporuke za karcinom dojke su određivanje gustine TIL-a isključivo u stromalnom kompartmanu unutar granica invazivne margine tumora. Stoga su opravdani dalji naponi na standardizaciji i optimizaciji određivanja imunoscora. U ovoj studiji immunoskor nije određivan pre svega zbog ograničenih resursa, a i zbog nedostataka u standardizaciji same metode.



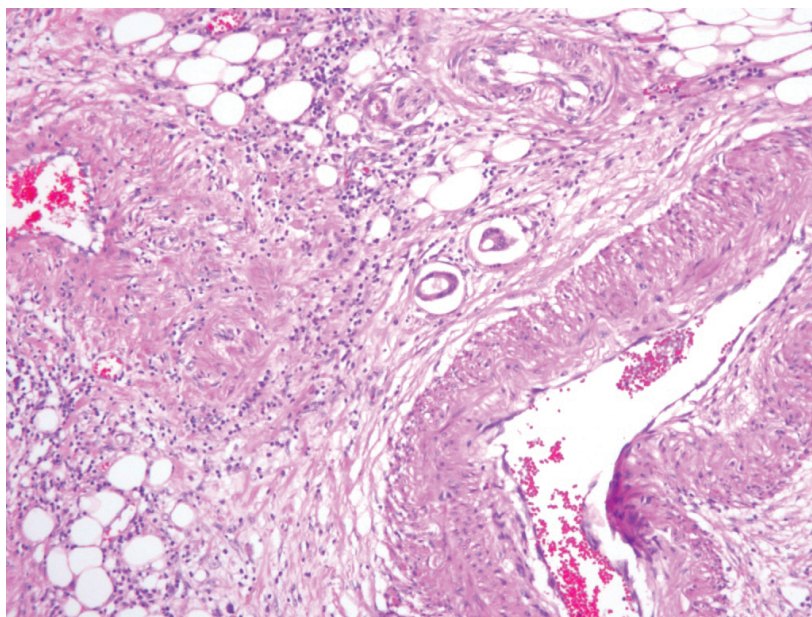
Slika 15. Mikromorfološki prikaz intraepitelne i stromalne peritumorske limfocitne infiltracije kod pacijenta sa adenokarcinomom kolona, HE x100

1.7.7. Limfovaskularna invazija

Limfovaskularna invazija (LVI) predstavlja prisustvo pojedinačnih ili manjih grupa tumorskih ćelija u lumenima limfnih i/ili krvnih sudova (Slika 16 i 17).



Slika 16. Histopatološki prikaz klastera tumorskih ćelija u lumenu krvnog suda između neoplastičnih žlezdanih formacija kod pacijenta sa karcinoma kolona, HE x100



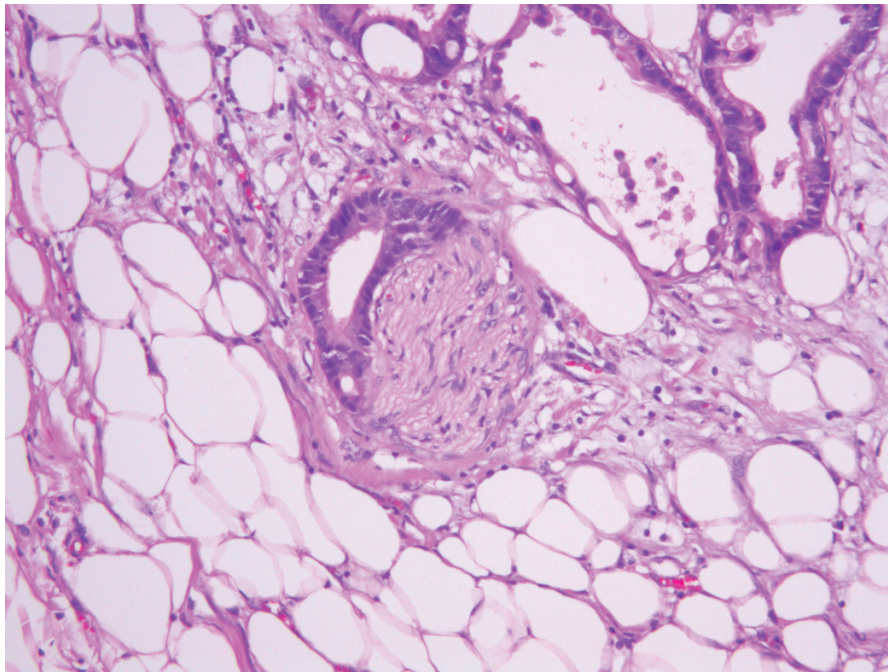
Slika 17. Prisustvo manjih grupa tumorskih ćelija u lumenu limfnih sudova u okolini krvnog suda zadebljanog zida kod pacijenta sa karcinomom debelog creva, HE x100

Tumorski embolus u lumenu obloženog endotelom sa prepoznatljivim slojem glatkih mišića ili sa prisutnom elastičnom laminom smatra se invazijom velikih krvnih sudova. Veoma je važno napraviti razliku između limfatične invazije i venske invazije zbog značajne korelacije venske invazije sa pojavom visceralnih metastaza i limfatične invazije sa metastazama u regionalnim limfnim nodusima (Roxburgh CS et al., 2010). IHC analiza ekspresije D2-40, CD31 i CD34 markera može se dodatno sprovesti radi lakše identifikacije. Nekada može biti teško razlikovati male krvne sudove, kapilare i limfatike od artefakata na patohistološkim presecima bojenim standardnom hematoksilin-eozin metodom (Panarelli NC et al., 2013). Invazija vena može biti ekstramuralna (invazija krvnih sudova izvan muskularis proprije) ili intramuralna (invazija krvnih sudova u submukozi ili muskularis propriji). Ekstramuralna invazija vena predstavlja nezavisni nepovoljni prognostički faktor i faktor rizika za pojavu udaljenih metastaza. Nalaz invazije krvnih sudova je od veće važnosti u odnosu na nalaz limfatične invazije (Roxburgh CS et al., 2010; Betge J et al., 2012). Studije pokazuju da pacijenti sa patohistološki verifikovanom venskom invazijom imaju drastično lošiju prognozu od bolesnika koji su u istom stadijumu bolesti, ali bez venske invazije (Compton CC et al., 2000; Zlobec I et al., 2008).

1.7.8. Perineuralna invazija

Perineuralna invazija (PNI) je nezavisan prediktor loše prognoze kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom (Liebig C et al., 2009) i predstavlja esencijalni element patohistološkog izveštaja. Perineuralnu invaziju karakteriše prisustvo tumorskih ćelija oko nervnih struktura uključujući 33%

cirkumference, kao i prisustvo tumorskih ćelija unutar bilo kojeg od tri nervna omotača (epineurijum, perineurijum i endoneurijum) - Slika 18. Nalaz PNI predstavlja negativan prognostički faktor dobro poznat kod karcinoma prostate, kod tumora ekstraintestinalnih lokalizacija i kod kolorektalnih karcinoma (Fagan JJ et al., 1998, Taille A et al., 1999; Takahashi T et al., 1997). Istraživanja pokazuju da pacijenti u stadijumu II sa PNI imaju lošije preživljavanje od pacijenata u stadijumu III bez PNI (Yang Y et al., 2015). Perineuralna invazija predstavlja važan deo histopatološkog izveštaja CRC-a i može se proceniti na rutinski bojenim HE preparatima, bez dodatnih imunohistohemijskih analiza.



Slika 18. Mikromorfološki prikaz perineuralne invazije kod pacijenta sa karcinomom kolona, HE x200

1.8. KLINIČKA SLIKA

Klinička slika kolorektalnog karcinoma zavisi od anatomske lokalizacije tumora, veličine i proširenosti tumorskog procesa. U inicijalnom stadijumu bolesti simptomi se ne registruju i uglavnom su godinama asimptomatski. Karcinomi cekuma i desnostrani karcinomi debelog creva mogu biti

praćeni zamaranjem, opštom slabošću i okultnim krvarenjem, bez razvoja opstruktivnih smetnji. Mikrocitna hipohromna anemija je često prvi simptom kao posledica krvarenja, koju prati malak-salost, zamor, slabost, bolovi u mišićima i zglobovima. Može doći do razvoja opstrukcije lumena creva, češće kod levostrane anatomske lokalizacije tumora i stenozirajućeg rasta tumorske mase sa pratećim simptomima opstrukcije. Uglavnom je prisutan bol u donje levom kvadrantu abdomena, poremećaj pasáže creva, okultna krvarenja i gubitak na težini. Karcinomi rektuma mogu uzrokovati konstipaciju, poremećaj u pražnjenju crevnog sadržaja, bol u donjem delu abdomena i prisustvo sveže krvi u stolici (Stevović D, 2002).

1.9. DIJAGNOSTIKA

Najčešće korišćene dijagnostičke procedure kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom su: kolonoskopija i rektoskopija, fleksibilna i rigidna rektosigmoidoskopija, kolonografija kompjuterizovanom tomografijom, digitorektalni pregled i irigografija.

Kolonoskopija predstavlja “zlatni standard” u dijagnostici CRC-a (Fureder T et al., 2012). Definitivna dijagnoza se postavlja patohistološkim pregledom tkivnih isečaka nakon urađenih određenih dijagnostičkih procedura. Da bi se utvrdila uznapredovala bolest potrebno je dalje sprovesti sledeće specifične procedure:

- Rentgen pluća
- Endoanalni ultrazvuk
- Kompjuterizovanu tomografiju abdomena
- Magnetnu rezonancu abdomena
- „Imaging” metode drugih delova tela ukoliko je to potrebno

Kod pacijenata sa CRC-om tumorski markeri su povišeni u oko 40% slučajeva i predstavljaju dobar pokazatelj recidiva bolesti. Rutinski se određuju karcinoembrionalni antigen (CEA) i CA19-9, kako bi se dobile bazične vrednosti za dalje praćenje dinamike bolesti. Ovaj test nije strogo specifičan za kolorektalni karcinom, jer se i kod karcinoma drugih lokalizacija kao što su karcinom dojke, pluća, želuca, mogu naći povišene vrednosti ovih tumorskih markera. Kod 40% pacijenata sa CRC-om su prisutne povišene vrednosti CEA, te se ne savetuje upotreba u cilju skrininga. Njihov

značaj je u u postoperativnom praćenju pacijenata, u smislu ponovnog javljanja karcinoma nakon sprovedenog lečenja (Duffy MJ, 2001).

1.10. TERAPIJA

1.10.1. Hiruško lečenje

Hiruška terapija kolorektalnih karcinoma podrazumeva hirušku resekciju segmenta creva zahvaćenog tumorskim procesom, poštujući ustanovljene onkološke principe. Nakon uvođenja kompletne mezokolične ekscizije sa centralnom ligacijom krvnih sudova, osnovni principi hiruškog lečenja kolorektalnog karcinoma su gotovo identični (Hohenberger W et al., 2009)

- Resekcija segmenta creva sa tumorom
- Kompletna ekscizija limfovaskularne peteljke - “en bloc”
- Bezbedne lateralne linije resekcije
- Dovoljan “distalni i proksimalni klirens”

1.10.2. Hemioterapija

Hemioterapija zauzima važno mesto u terapijskom lečenju CRC-a. Može se primeniti pre ili posle hiruškog lečenja u okviru neoadjuvantne ili adjuvantne hemioterapije. 5-FU bazirani protokoli lečenja predstavljaju „kamen temeljac” hemioterapijskog lečenja pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. Svi pacijenti sa CRC-om u III stadijumu bolesti i visoko rizični pacijenti u II stadijumu se smatraju adekvatnim za adjuvantno hemioterapijsko lečenje. Kao standardni protokol prema nacionalnim vodičima preporučuje se primena hemioterapeutika na bazi 5-FU/leukovorina za pacijente sa CRC-om u II stadijumu bolesti sa visokim rizikom, a u III stadijumu primena oralnih fluoropirimidina (kapecitabina). Trenutno, Američka i Evropska Udruženja (engl. American Society of Clinical Oncology-ASCO, European Society for Medical Oncology-ESMO) su dala jasne smernice definisanja visoko rizičnih pacijenata sa CRC-om u stadijumu II. „High risk” stadijum II kolorektalnog karcinoma podrazumeva sledeće: loše diferentovane tumore, prisustvo limfovaskularne i perineuralne invazije, prisustvo opstrukcije i perforacije creva, kao i manje od dvanaest pregledanih limfnih čvorova (Costas-Chavarri A et al., 2019; Labianca R et al., 2013; Provenzale D et al., 2018).

Tokom 2017. godine, Američka Uprava za hranu i lekove odobrila je korišćenje leka druge linije pembrolizumaba koji je ciljao imunološke kontrolne tačke programiranog proteina ćelijske smrti 1, PDL-1 - za lečenje odraslih i pedijatrijskih pacijenata sa neoperabilnim ili solidnim tumorima koji pokazuju deficit MMR sistema i/ili visok nivo mikrosatelitske nestabilnosti. Ovo odobrenje je takodje prošireno na kolorektalne karcinome sa deficitom MMR sistema i/ili visokim nivoom mikrosatelitske nestabilnosti koji nisu pokazali zadovoljavajući hemioterapijski tretman na bazi 5-FU, oksaliplatine i irinotekana. Studija iz 2015. godine je prvi put izvestila o potencijalnoj efikasnosti pembrolizumaba u lečenju karcinoma koji su pokazali deficit MMR statusa ili mikrosatelitsku nestabilnost. Istraživači su primetili da su pacijenti sa deficitom MMR-a koji su primali pembrolizumab imali 40%, odnosno 67% povećanje stope objektivnog odgovora, odnosno preživljavanja bez bolesti, u poređenju sa tumorima bez deficita (Le DT et al., 2015). Imunološke kontrolne tačke (eng. Immune checkpoints) su interakcije receptora liganda koje pojačavaju ili smanjuju aktivaciju T-limfocita. Interakcija receptora programirane smrti (eng. Programmed death receptor-1, PD-1) sa ligandom programirane smrti (engl. Programmed death ligand-1, PD-L1) ima supresivno dejstvo na T-limfocite, tako što sprečava njihovu preteranu aktivaciju tokom zapaljenja. Tumorske ćelije kolorektalnog karcinoma, takođe mogu da ekspimiraju PD-L1 i koriste to kao strategiju da izbegnu imunološki odgovor od strane domaćina tako što se vezuju za PD-1 na T-limfocitima i indukuju njihovu anergiju i apoptozu. Pored toga, MSI/dMMR biomarkeri ukazuju na hipermutabilnost tumora, što može promovisati prepoznavanje imunog sistema i odgovor na imunoterapije anti-PD-1 (Andrews MC et al., 2017; Le DT et al., 2017).

Primenjeni hiruški tretmani i hemioterapeutici u stadijumu II i III kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom:

1. U stadijumu II primenjena vrsta tretmana je sledeća: široka desnostrana ili levostrana resekcija sa anastomozom. Kod „high risk“ stadijuma II može se primeniti adjuvantna hemioterapija nakon hiruškog tretmana. Svi pacijenti ovog stadijuma moraju se razmatrati za ulazak u randomizovana klinička ispitivanja koja procenjuju nove opcije za adjuvantno lečenje.
2. U stadijumu III primenjene vrste tretmana su: široka desnostrana ili levostrana hemikolektomija sa primarnom anastomozom, adjuvantna hemioterapija na bazi oksaliplatine i 5-FU/LV (FOLFOX 4 ili FLOX) prema Američkim i Evropskim Preporukama (ASCO i ESMO). Kada je oksaliplatina kontraindikovana moguće je primeniti monoterapiju na bazi 5-FU/leukovorin ili primeniti oralne fluoropirimidine. U našoj zemlji nije moguće primeniti oksaliplatinu već se u adjuvantnom tretmanu primenjuju fluoropirimidini kao infuzioni ili bolusni vid terapije.

Kolorektalni karcinomi su heterogena grupa tumora sa nepredvidivim tokom i ishodom bolesti. Postoji značajna varijabilnost u kliničkom ishodu kod pacijenata u istom stadijumu bolesti, koja može biti rezultat molekularne heterogenosti tumora. Ovo nameće potrebu da se pronađu novi prognostički faktori koji bi identifikovali pacijente u cilju personalizovanog lečenja kolorektalnog karcinoma.

Hipoteza

Na osnovu dosadašnjih istraživanja postavljena je sledeća hipoteza:

Tumori sa deficitarnim MMR statusom pokazuju različite demografske, kliničke i mikromorfološke karakteristike (ženski pol, starost pacijenata ispod 50. godina, desnostrana anatomsko lokalizacija tumora, mucinska sekrecija, mucinozni adenokarcinomi, izražena peritumorska limfocitna infiltracija, prisustvo „Crohn-like“ reakcije, „low grade“ tumorsko pupljenje, viši histološki gradus, niži patološki stadijum, prisustvo perineuralne i limfovaskularne invazije) i predstavljaju prognostički marker koji ukazuje na duže preživljavanje pacijenata i bolju prognozu bolesti u odnosu na tumore sa proficijentnim MMR statusom.

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Utvrditi udeo pacijenata sa MMR deficitom u celokupnom ispitivanom uzorku
2. Analizirati fenomen heterogene ekspresije markera (MLH1, PMS2, MSH2 i MSH6) u tumorskim tkivima i okolnoj sluzokoži i njegove povezanosti sa demografskim, kliničkim i mikromorfološkim karakteristikama tumora (pol, starost, lokalizacija, mucinska sekrecija, histološki tip tumora, peritumorska limfocitna infiltracija, „Crohn-like“ reakcija, tumorsko pupljenje, histološki gradus, patološki stadijum, perineuralna invazija i limfovaskularna invazija), kao i povezanost sa ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem do progresije bolesti

3. Ispitati učestalost izostanka ekspresije markera MLH1 i njegovu povezanost sa demografskim, kliničkim i mikromorfološkim karakteristikama tumora (pol, starost, lokalizacija, mucinska sekrecija, histološki tip tumora, peritumorska limfocitna infiltracija, „Crohn-like“ reakcija, tumorsko pupljenje, histološki gradus, patološki stadijum, perineuralna invazija i limfovaskularna invazija), kao i povezanost sa ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem do progresije bolesti

4. Ispitati učestalost izostanka ekspresije markera PMS2 i njegovu povezanost sa demografskim, kliničkim i mikromorfološkim karakteristikama tumora (pol, starost, lokalizacija, mucinska sekrecija, histološki tip tumora, peritumorska limfocitna infiltracija, „Crohn-like“ reakcija, tumorsko pupljenje, histološki gradus, patološki stadijum, perineuralna invazija i limfovaskularna invazija), kao i povezanost sa ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem do progresije bolesti

5. Ispitati učestalost izostanka ekspresije markera MSH2 i njegovu povezanost sa demografskim, kliničkim i mikromorfološkim karakteristikama tumora (pol, starost, lokalizacija, mucinska sekrecija, histološki tip tumora, peritumorska limfocitna infiltracija, „Crohn-like“ reakcija, tumorsko pupljenje, histološki gradus, patološki stadijum, perineuralna invazija i limfovaskularna invazija), kao i povezanost sa ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem do progresije bolesti

6. Ispitati učestalost izostanka ekspresije markera MSH6 i njegovu povezanost sa demografskim, kliničkim i mikromorfološkim karakteristikama tumora (pol, starost, lokalizacija, mucinska sekrecija, histološki tip tumora, peritumorska limfocitna infiltracija, „Crohn-like“ reakcija, tumorsko pupljenje, histološki gradus, patološki stadijum, perineuralna invazija i limfovaskularna invazija), kao i povezanost sa ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem do progresije bolesti

7. Ispitati učestalost izostanka ekspresije heterodimernog para MLH1/PMS2 i njegovu povezanost sa demografskim, kliničkim i mikromorfološkim karakteristikama tumora (pol, starost, lokalizacija, mucinska sekrecija, histološki tip tumora, peritumorska limfocitna infiltracija, „Crohn-like“ reakcija, tumorsko pupljenje, histološki gradus, patološki stadijum, perineuralna invazija i limfovaskularna invazija), kao i povezanost sa ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem do progresije bolesti

8. Ispitati učestalost izostanka ekspresije heterodimernog para MSH2/MSH6 i njegovu povezanost sa demografskim, kliničkim i mikromorfološkim karakteristikama tumora (pol, starost, lokalizacija, mucinska sekrecija, histološki tip tumora, peritumorska limfocitna infiltracija, „Crohn-like“ reakcija, tumorsko pupljenje, histološki gradus, patološki stadijum, perineuralna invazija i limfovaskularna invazija), kao i povezanost sa ukupnim preživljavanjem i preživljavanjem do progresije bolesti

3.1. MATERIJAL

Studija je dizajnirana kao prospektivna i obuhvata 104 pacijenta sa hiruški resekovanim kolorektalnim adenokarcinomom koji su operisani na Hirurškoj klinici u Kliničkom Centru u Nišu. Nakon fiksacije u 10% rastvoru formalina, reprezentativni isečci su kalupljeni u parafinske blokove. Histopatološki isečci iz parafinskih blokova su bojani klasičnom hematoksilin-eozin metodom. Pregledom registra patohistoloških izveštaja iz arhive Centra za patologiju i patološku anatomiju u Nišu napravljena je selekcija parafinskih blokova sa uzorcima kolorektalnog karcinoma između 2018-2019. godine.

Patohistološki izveštaj sadrži sledeće podatke: histološki tip tumora, lokalizaciju, veličinu tumora, histološki gradus, izražen ili slabo prisutan limfocitni odgovor od strane domaćina, prisutnu ili odsutnu „Crohn-like“ reakciju, prisutnu ili odsutnu sekreciju mucina, prisutnu ili odsutnu peritumorsku limfovaskularnu i perineuralnu invaziju i patološki stadijum. Starost pacijenata je podeljena u dve grupe: osobe starosti 50. godina i manje i na osobe starije od 50. godina. Tumori lokalizovani u cekumu, ascendentnom kolonu i transverzalnom kolonu su klasifikovani kao desnostrani, u odnosu na tumore u descendentnom kolonu, sigmi i rektumu koji su levostrane anatomske lokalizacije. „Crohn-like“ reakcija je saopštavana kao prisutna (prisustvo limfoidnih folikula sa germinativnim centrima najmanje dva u okolini tumora) ili odsutna. Dubina invazije tumora, status limfnih nodusa i metastaze su korišćeni za određivanje patološkog stadijuma bolesti (TNM) definisanih od strane AJCC.

Kriterijumi za uključivanje u studiju: pacijenti starosti do 75. godina sa verifikovanim kolorektalnim adenokarcinomom iz hirurškog materijala u stadijumu II I III. Kriterijumi za isključivanje iz studije: biopsijski uzorci, pacijenti starosti preko 75. godina, kolorektalni karcinomi nastali na terenu inflamatornih bolesti creva, pacijenti sa kolorektalnim adenokarcinomom koji su primili preoperativnu hemioterapiju i/ili radioterapiju i drugi patohistološki tipovi kolorektalnih karcinoma.

3.2. METODE

3.2.1. Kvantifikacija tumorskog pupljenja

Kvantifikacija tumorskog pupljenja je određena pregledom svakog HE preparata na uvećanju x100, pri čemu je izvršena identifikacija polja sa najvećom gustinom pupoljaka koja se analizira na povećanju x200. Polje sa najvećim brojem pupoljaka se smatra reprezentativnim (u polju dimenzije 0,785 mm²) definisanim od strane ITBCC sistema. U ovoj studiji korišćen je dvostepeni sistem podele tumorskih pupoljaka na „low grade“ (0-9 tumorskih pupoljaka) i „high grade“ (više od 10 tumorskih pupoljaka).

3.2.2. Imunohistohemijska analiza

Od parafinskih kalupa mikrotomski su načinjeni preseći debljine oko 4 µm koji su zatim adherirani na „super frost“ pločice. Imunohistohemijska analiza je manuelno urađena i sprovedena u laboratorijama Katedre za histologiju i embriologiju na Medicinskom fakultetu u Nišu. Nakon deparafinacije i hidratacije isečaka kroz ksilol i seriju alkohola opadajuće koncentracije 100%, 95%, 80%, rađeno je demaskiranje antigena na 95 C u vodenom kupatilu 30 minuta, a potom hlađenje na sobnoj temperature. Nakon toga je sledilo ispiranje i blokiranje endogene peroksidaze 3% vodonikom deset minuta. Isečci su ispirani u puferu PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4 tri puta po pet minuta, a zatim je nanošeno primarno antitelo uz inkubaciju od 40 minuta na sobnoj temperature. Posle ispiranja PBS-om nanošeno je sekundarno antitelo uz inkubacioni period od 20 minuta takođe na sobnoj temperaturi. Između svakog koraka je rađeno ispiranje PBS-om tri puta po pet minuta. Tehnikom imunohistohemijskog obeležavanja ispitivalo se prisustvo ili odsustvo jedarne imunoreaktivnosti tumorskih ćelija na enzime popravke replikacionih grešaka DNK (enzimi MLH1, clone ES05; PMS2, clone EP51; MSH2, clone FE11 i MSH6, clone EP49). Korišćena je pozitivna unutrašnja kontrola na svakom preparatu: neizmenjeni okolni epitel, limfociti i stromalne ćelije. Monoklonalna antitela su od istog proizvođača (Dako, Glostrup, Danska), u formi Ready-to-use (Tabela 5).

Tabela 5. Nazivi i šifre korišćenih antitela

Šifra	Naziv
IRO7961	FLEX Monoclonal mouse X-H MLH1, Clone ES05, 12ml RTU
IRO8561	FLEX Mo Mouse a Hu MutS Protein Homolo 2, Clone FE11, 12ml RTU
IRO8661	FLEX Mo Mouse a Hu MutS Protein Homolo 6, Clone EP49, 12ml RTU
IRO8761	FLEX Monoclonal mouse X-H PMS2, Clone EP51, 12ml RTU

Za vizuelizaciju je upotrebljen vizuelizacioni sistem En Vision sa hromogenom diaminobenzidinom-DAB (Dako, Glostrup, Danska). Mayer-ov hematoksilin je korišćen kao kontrastno bojenje. Mikrofotografije patohistoloških preparata su dobijene slikanjem tkivnih uzoraka na svetlosnom mikroskopu (Olympus BX50, Tokyo, Japan), opremljenim digitalnom kamerom Leica Microsystems, Reuil-Malmaison, France DFC295. Mikroskop je povezan sa PS-računarskim sistemom koji obavlja skladištenje slika u TIFF formatu (Tagged Image File Format) i JPEG-u (Joint Picture Experts Group).

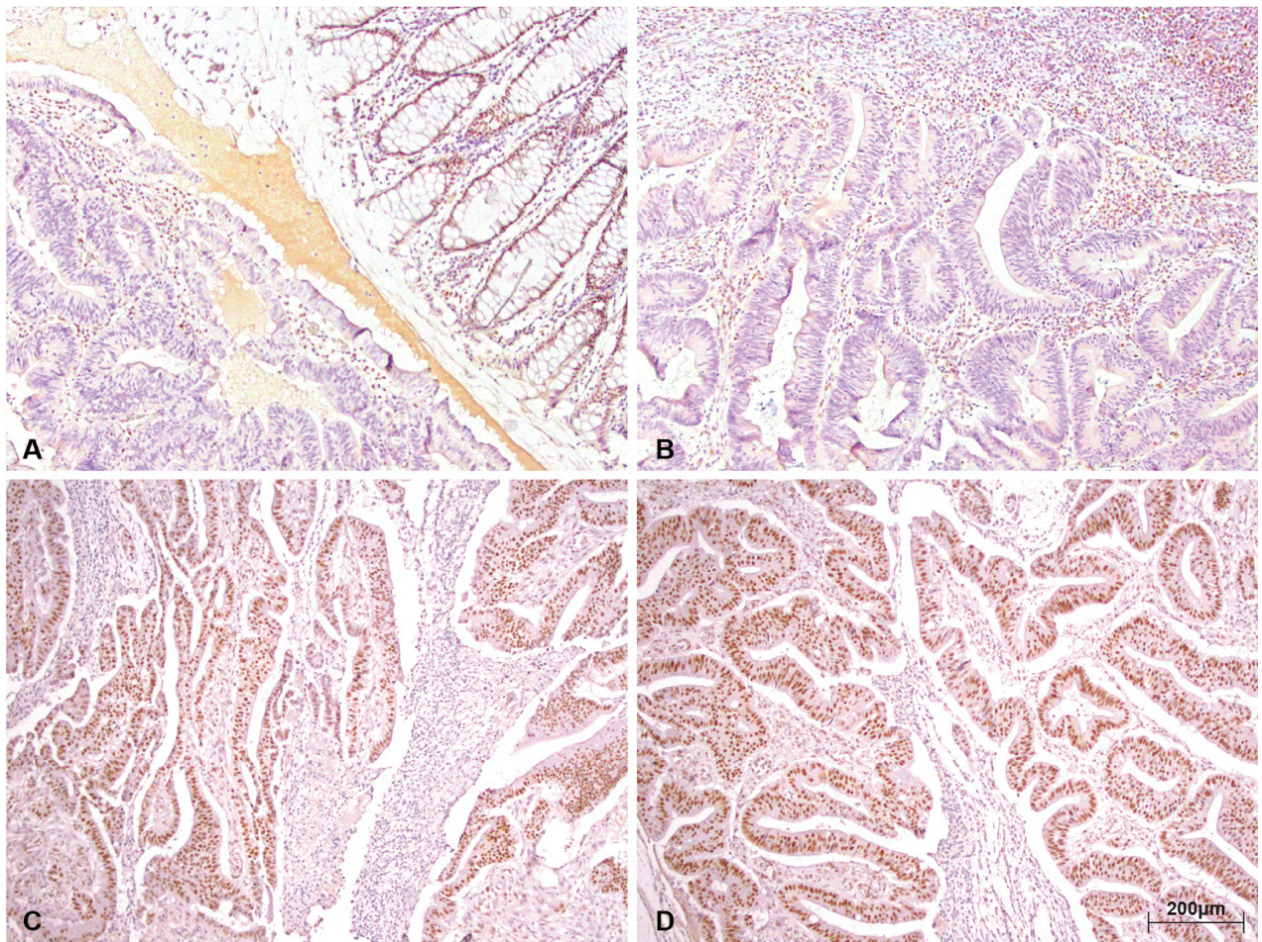
Prema protokolu od strane CAP za interpretaciju imunohistohemijske analize, svako nuklearno bojanje se smatra pozitivnim, a samo apsolutno odsustvo nuklearnog bojenja se smatra „gubitkom ekspresije“ pod uslovom da su unutrašnje kontrole pozitivne. Stoga se karcinom smatra deficitarnim (dMMR) kada postoji gubitak nuklearne ekspresije za najmanje jedan MMR protein. Karcinom se smatra proficijentnim MMR-om (pMMR) kada je očuvana nuklearna ekspresija sva četiti MMR proteina. Okolni normalan epitel debelog creva i rektuma, limfociti i stromalne ćelije poslužili su kao pozitivne unutrašnje kontrole. Patohistološki slučajevi su najpre klasifikovani u dve velike grupe: deficitantni MMR i proficijentni MMR, a kasnije je izdvojena još jedna grupa (heterogeni MMR, hMMR) u odnosu na gubitak imunoreaktivnosti tumorskih ćelija. Gubitak ekspresije proteina je zatim grupisan u sledeće kategorije: gubitak ekspresije heterodimernog para MLH1/PMS2, gubitak ekspresije MSH2/MSH6 proteina, izolovani gubitak ekspresije PMS2 i MSH6 proteina. Izolovani gubitak ekspresije MLH1 i MSH2 proteina nije registrovan u našoj studiji. Mikromorfološki je heterogena ekspresija MMR proteina grupisana u tri kategorije: zonalna, intraglandularna i kombinacija zonalne i intraglandularne heterogene/neujednačene ekspresije proteina.

3.3. STATISTIČKA ANALIZA

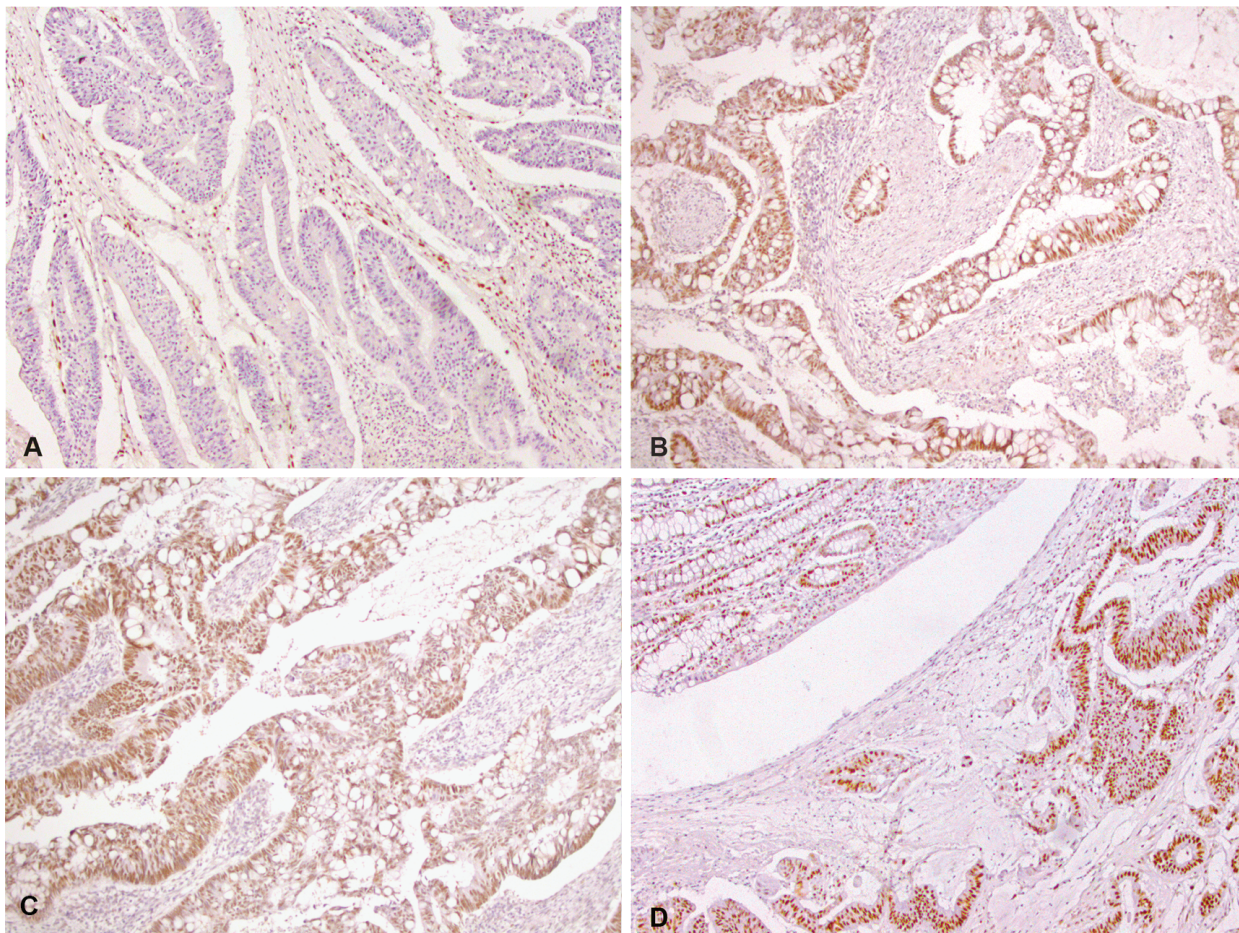
Statistička analiza izvršena je pomoću softvera SPSSver. 17,0 (SPSS Inc, Čikago, IL, SAD). Kategoričke promenljive date su kao frekvencije (n) i u procentima (%). Poređenje distribucije demografskih, kliničkih i histopatoloških karakteristika između ispitivanih grupa izvršeno je korišćenjem χ -kvadrat testa i Fisher-ovog testa. Analiza veze između karcinoma sa deficitom MMR-a i faktora od interesa izvršena je univarijantnom i multivarijantnom logističkom regresionom analizom (izračunata vrednost odnosa šansi (OR) i njenih 95% intervala pouzdanosti-95% CI). Preživljavanje bez bolesti analizirano je metodom Kaplan-Meier i Log-rank testom. Za procenu krivih preživljavanja usvojena je Kaplan-Meier metoda, a za upoređivanje vremena preživljavanja pacijenata korišćen je Log-rank test. Preživljavanje je računato od primarne dijagnoze kolorektalnog karcinoma do pojave recidiva. Vrednost p manje od 0,05 smatrana je za statistički značajnu razliku. Univarijantnim i multivarijantnim Cox hazard regresionim modelima je ispitan značaj deficitarnih MMR-a i pojedinih demografskih, kliničkih i histopatoloških parametara za preživljavanje i pojavu recidiva bolesti.

Od 104 pacijenta sa kolorektalnim karcinomom, gubitak nuklearne ekspresije najmanje jednog MMR proteina zabeležen je u 12 (11.54%) slučajeva. Najučestaliji obrazac je gubitak ekspresije heterodimernog para MLH1/PMS2 proteina pronađen kod 7 (6.73%) pacijenata - Slika 1. Drugi po učestalosti je izolovani gubitak ekspresije PMS2 proteina zabeležen u 3 (2.88%) ispitanika – Slika 2. Gubitak ekspresije MSH2/MSH6 proteina je evidentiran kod 1 (0.96%) pacijenta kao i gubitak ekspresije MSH6 proteina – Slika 3 i Slika 4. Izolovani gubici nuklearne ekspresije proteina MLH1 i MSH2 nisu nađeni.

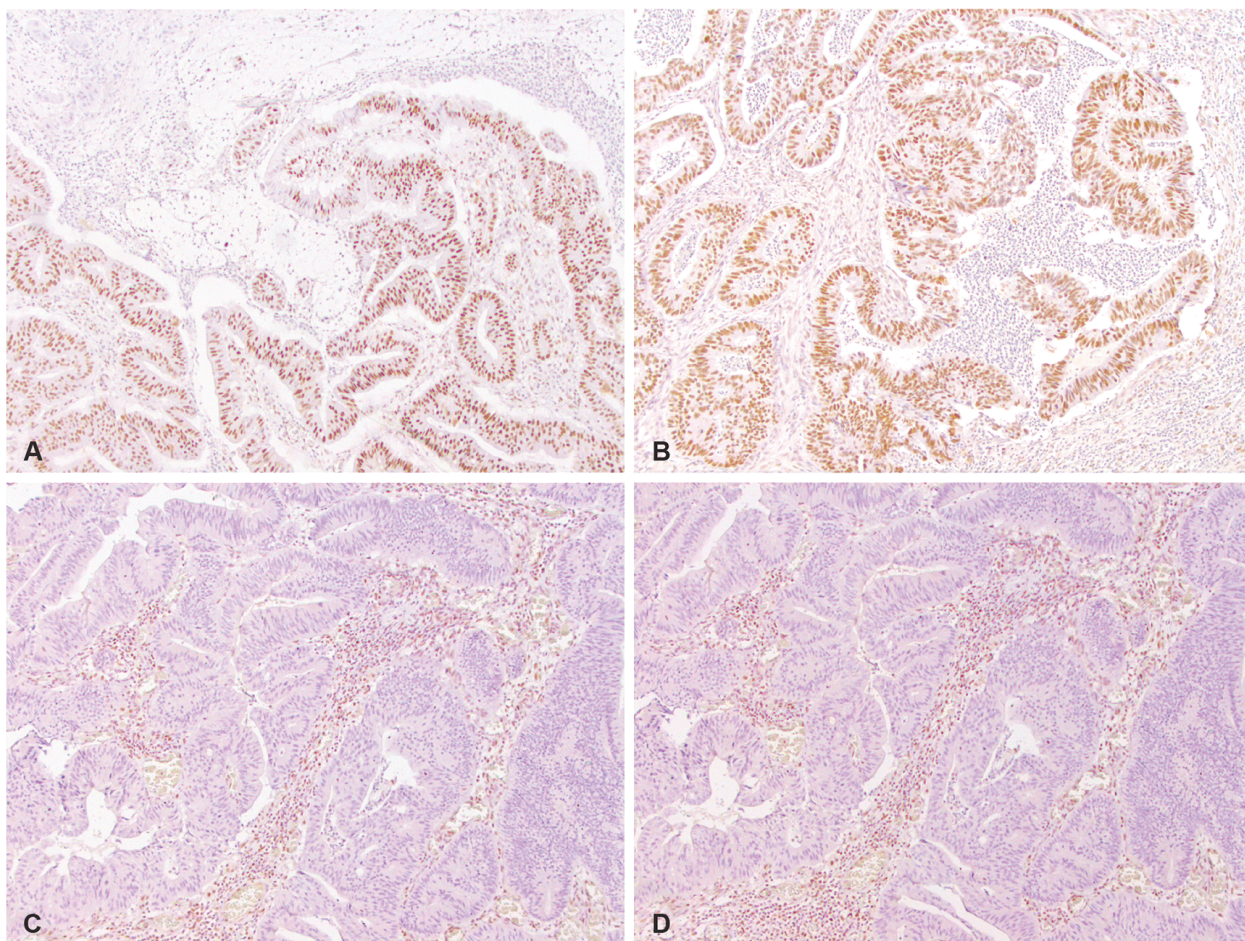
Rezultati ove studije pokazali su različite demografske, kliničke i patohistološke karakteristike deficitarnih MMR-a kod pacijenata sa hirurški resekovanim kolorektalnim karcinomom u stadijumu II I III (Tabela 1).



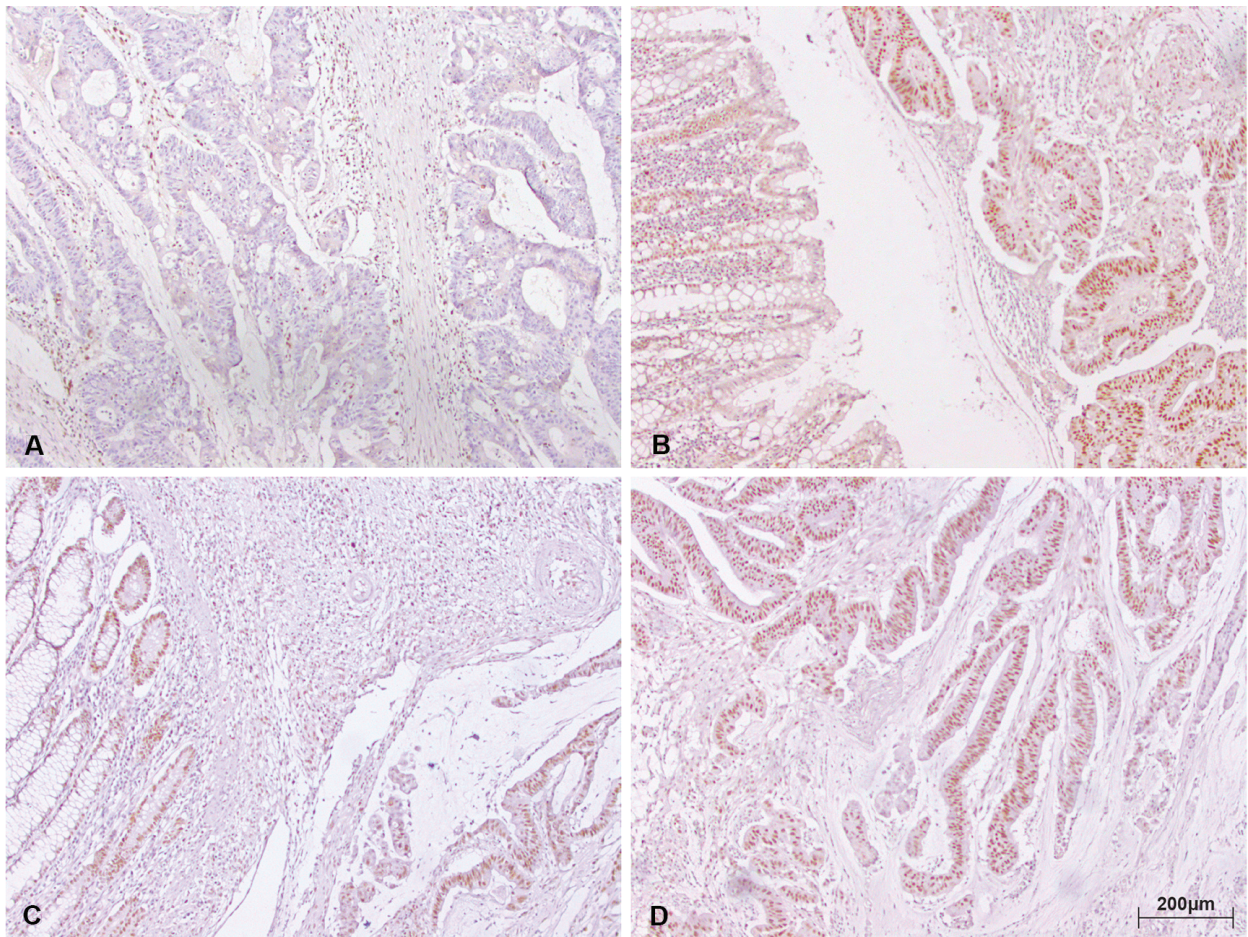
Slika 1. Imunohistohemijski obrazac deficijentnog MMR-a kod pacijenta sa kolorektalnim karcinomom x100, sa gubitkom nuklearne ekspresije MLH1 (A) i PMS2 proteina (B), i sa intaktnom ekspresijom MSH2 (C) i MSH6 proteina (D)



Slika 2. Imunohistohemijski obrazac deficijentnog MMR-a kod pacijenta sa kolorektalnim karcinomom x100, sa gubitkom nuklearne ekspresije PMS2 proteina (A), i intaktnom ekspresijom MLH1 (B), MSH2 (C) i MSH6 proteina (D)



Slika 3. Imunohistohemijski obrazac deficijentnog MMR-a kod pacijenta sa kolorektalnim karcinomom x100, sa proficijentnom nuklearnom ekspresijom MLH1 (A) i PMS2 proteina (B), i deficijentnom ekspresijom MSH2 (C) i MSH6 proteina (D)



Slika 4. Imunohistohemijski obrazac deficijentnog MMR-a kod pacijenta sa kolorektalnim karcinomom x100, sa deficijentnom nuklearnom ekspresijom MSH6 proteina (A), i intaktnom ekspresijom MSH2 (B), MLH1 (C) PMS2 proteina (D)

Tabela 1. Demografske, kliničke i mikromorfološke karakteristike pacijenata sa kolorektalnim karcinomom u odnosu na ekspresiju MMR proteina (proficijentni i deficijentni)

Karakteristike	Deficijentni MMR (n = 12)		Proficijentni MMR (n = 92)		Ukupno (n = 104)		p Value
Godine starosti							
≤50	9	(75.00%)	6	(6.52%)	15	(14.42%)	0.0000***
>50	3	(25.00%)	86	(93.48%)	89	(85.58%)	
Pol							
Ženski	7	(58.33%)	39	(42.39%)	46	(44.23%)	0.2980
Muški	5	(41.67%)	53	(57.61%)	58	(55.77%)	
Lokalizacija tumora							
Desnostrana	10	(83.33%)	22	(23.91%)	32	(30.77%)	0.0001***
Levostrana	2	(16.67%)	70	(76.09%)	72	(69.23%)	
Primenjena hemioterapija na bazi 5-FU							
Primenjena	11	(91.67%)	62	(67.39%)	73	(70.19%)	0.1031
TNM stadijum							
Stadijum III	7	58.33%	48	52.17%	55	52.88%	0.765
Stadijum II	5	41.67%	44	47.83%	49	47.12%	
Histološki tip tumora							
Konvencionalni adenokarcinom	10	(83.33%)	66	(71.74%)	76	(73.08%)	0.5066
Mucinozni adenokarcinom	2	(16.67%)	26	(28.26%)	28	(26.92%)	

Gradus tumora							
„High-grade“	9	(75.00%)	53	(57.61%)	62	(59.62%)	0.3525
„Low-grade“	3	(25.00%)	39	(42.39%)	42	(40.38%)	
Sekrecija mucina							
Prisutna	7	(58.33%)	28	(30.43%)	35	(33.65%)	0.0999
Odsutna	5	(41.67%)	64	(69.57%)	69	(66.35%)	
Peritumorska limfocitna infiltracija							
Izražena	8	(66.67%)	39	(42.39%)	47	(45.19%)	0.1137
Slabo prisutna	4	(33.33%)	53	(57.61%)	57	(54.81%)	
„Crohn’s-like“ reakcija							
Pozitivna	8	(66.67%)	13	(14.13%)	21	(20.19%)	0.0002***
Negativna	4	(33.33%)	79	(85.87%)	83	(79.81%)	
Tumorsko pupljenje							
„High-grade“	9	(75.00%)	17	(18.48%)	26	(25.00%)	0.0000
„Low-grade“	3	(25.00%)	75	81.25%	78	75.00%	
Limfovaskularna invazija							
Prisutna	8	66.67%	49	53.26%	57	54.81%	0.540
Odsutna	4	33.33%	43	46.74%	47	45.19%	
Perineuralna invazija							
Prisutna	6	50.00%	43	46.74%	49	47.12%	10.000
Odsutna	6	50.00%	49	53.26%	55	52.88%	

Podaci su prikazani kao frekvence (n) i kao procenti (%)

***- $p < 0.001$, mismatch repair-MMR, veličina tumora, status limfnih nodusa i metastaza-TNM

Najmlađi pacijent je imao 23 godine, dok je najstariji imao 75 godina. Srednja starost pacijenata je bila 62.97 ± 12.09 godina, dok je medijana iznosila 66 godina. U grupi sa gubitkom IHC ekspresije MMR proteina bilo je više pacijenata mlađih od 50 godina (9/12; 75.00%). Suprotno tome, intaktna imunohistohemijska ekspresija MMR bila je uobičajena za pacijenate starije od 50 godina (93.48%). Raspodela pacijenata mlađih od 50 godina u grupi sa dMMR bila je statistički značajno veća u poređenju sa grupom bez nedostatka MMR ($p < 0.001$).

Kod 32 (30.77%) pacijenta karcinom je lokalizovan na desnoj strani debelog creva, a kod 72 (69.23%) pacijenta je bio lokalizovan levostrano i u rektumu. Desnostrana anatomsko lokalizacija tumora bila je statistički značajno češća kod pacijenata sa dMMR ($n = 10$; 83.33%) nego kod pacijenata bez gubitka ekspresije ($n = 22$; 23.91%) MMR proteina ($p < 0.001$).

Pozitivna „Crohn-like“ reakcija u okolini tumorske mase otkrivena je samo kod 20.19% ispitanih slučajeva. Međutim, u grupi sa deficitom MMR-a „Crohn-like“ reakcija bila je znatno prisutnija ($n = 8$; 66.67%), dok je u grupi pacijenata sa intaktnom ekspresijom MMR-a takva reakcija uglavnom izostajala ($n = 79$; 85.87%). Pozitivna „Crohn-like“ reakcija bila je statistički značajno češća kod pacijenata sa dMMR nego kod pacijenata sa proficijentnom ekspresijom MMR proteina ($p < 0.001$).

Kolorektalni karcinomi sa „high grade“ tumorskim pupljenjem otkriveni su kod 26 (25.00%) pacijenata i raspoređeni su u obe grupe, uz veću distribuciju kod pacijenata sa dMMR ($n = 9$; 75.00%) u poređenju sa pacijentima bez gubitka imunohistohemijske ekspresije MMR proteina ($n = 17$; 18.48%).

Karcinomi sa dMMR-om bili su značajno povezani sa uzrastom do 50 godina, pozitivnom „Crohn-like“ reakcijom, desnostranom lokalizacijom tumora i visokim gradusom tumorskog pupljenja ($p < 0,001$). Nije uočena statistički značajna povezanost deficitarnih MMR karcinoma sa sledećim karakteristikama kao što su: pol, histološki tip tumora, sekrecija mucina, peritumorska limfocitna infiltracija, histološki gradus tumora, limfovaskularna invazija, perineuralno širenje, prisustvo metastaza u regionalnim limfnim nodusima, patološki stadijum bolesti i primenjena postoperativna hemioterapija na bazi 5-FU.

Univarijantna logistička regresijska analiza pokazala je da su značajni prediktori deficitarnih MMR tumora: pacijenti mlađi od 50 godina, desnostrana lokalizacija tumora, pozitivna „Crohn-like“ reakcija i visok gradus tumorskog pupljenja (Tabela 2). Izražavanje pomenutih faktora koji ukazuju na povećan rizik od dMMR je pokazalo: pacijenti mlađi od 50 godina-43.000 puta (9.157 do 201.922 puta, $p < 0.001$), desnostrana lokalizacija tumora-15.909 puta (3.238 do 78.168 puta, $p < 0.001$) i „Crohn-like“ reakcija-1.562 puta (1.002 do 2.434 puta, $p < 0.05$).

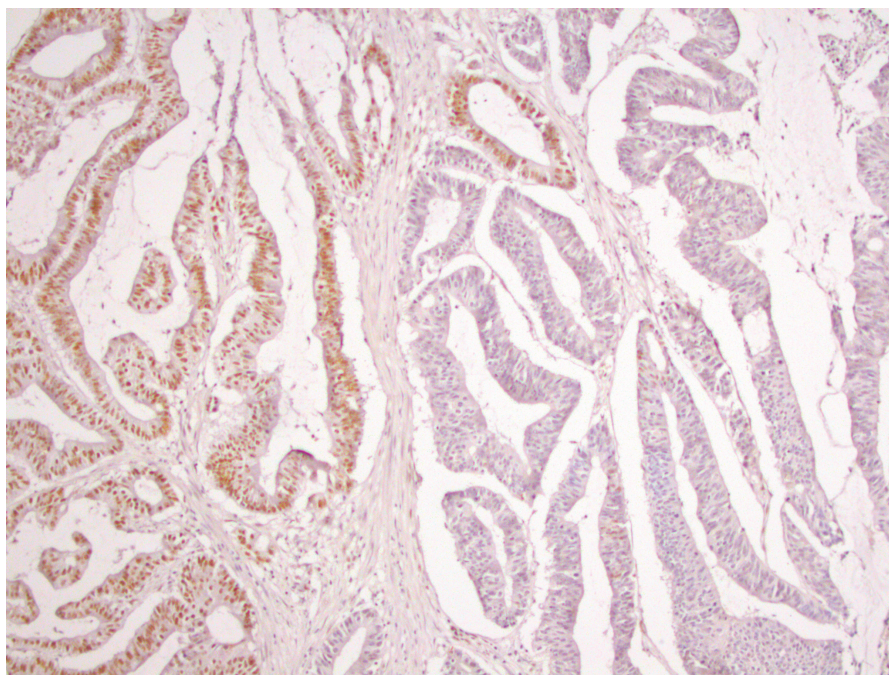
Faktori za koje je univarijantna logistička regresija pokazala značajan uticaj na dMMR uključeni su u multivarijantne modele regresije. Multivarijantna logistička regresiona analiza (Enter Method) je pokazala najvažnije prediktore dMMR statusa: pacijenti mlađi od 50 godina i desnostrana lokalizacija tumora (Tabela 2). Ovi faktori ukazuju na značajno veći rizik prisustva deficita MMR-a: za starost manju od 50 godina-51 put ($p < 0.001$) i desnostranu lokalizaciju tumora-15 puta ($p < 0.05$). Regresijski model kao nezavisne promenljive sadrži ta dva faktora, a regresiona konstanta objašnjava 34.5-67.5% varijabilnosti u grupi pacijenata sa deficitom MMR-a.

Tabela 2. Univarijantna i multivarijantna regresiona analiza

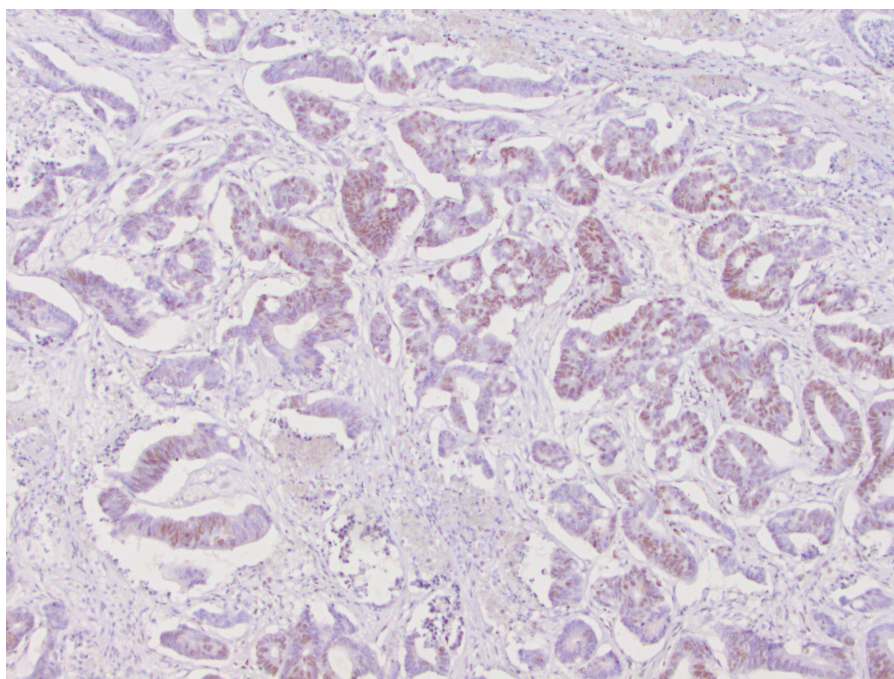
Univarijantna regresiona analiza	p Value	OR	(95% CI of OR)
Faktor			
Godine starosti ≤ 50 years	<0.001	43.000	(9.157–201.922)
Ženski pol	0.3014	1.903	(0.562–6.443)
Desnostrana lokalizacija tumora	<0.001	15.909	(3.238–78.168)
TNM stadijum (III)	0.688	1.283	(0.379–4.340)
Konvencionalni adenokarcinom	0.4018	1.970	(0.404–9.606)
„High-grade“ tumor	0.2574	2.208	(0.561–8.692)
Prisustvo mucinske sekrecije	0.0639	3.200	(0.935–10.954)
Izražena peritumorska limfocitna infiltracija	0.1226	2.718	(0.764–9.673)
„Crohn’s-like“ reakcija (pozitivna)	<0.001	12.154	(3.195–46.227)
Tumorsko pupljenje „high-grade“	<0.001	13.235	(3.235–54.142)
Prisutna limfovaskularna invazija	0.385	1.755	(0.494–6.238)
Prisutna perineuralna invazija	0.832	1.140	(0.342–3.796)
Multivarijantna regresiona analiza	p Value	OR	(95% CI of OR)
Faktor			
Godine starosti ≤ 50 years	<0.001	77.924	(8.029–756.225)
Desnostrana lokalizacija tumora	0.0048	30.491	(2.843–327.060)
„Crohn’s-like“ reakcija (pozitivna)	0.236	3.483	(0.442–27.422)
Tumorsko pupljenje „high-grade“	0.280	2.872	(0.424–19.436)
Konstanta	<0.001	0.004	(3.195–46.227)

OR—Odds ratio, CI—Confidence interval.

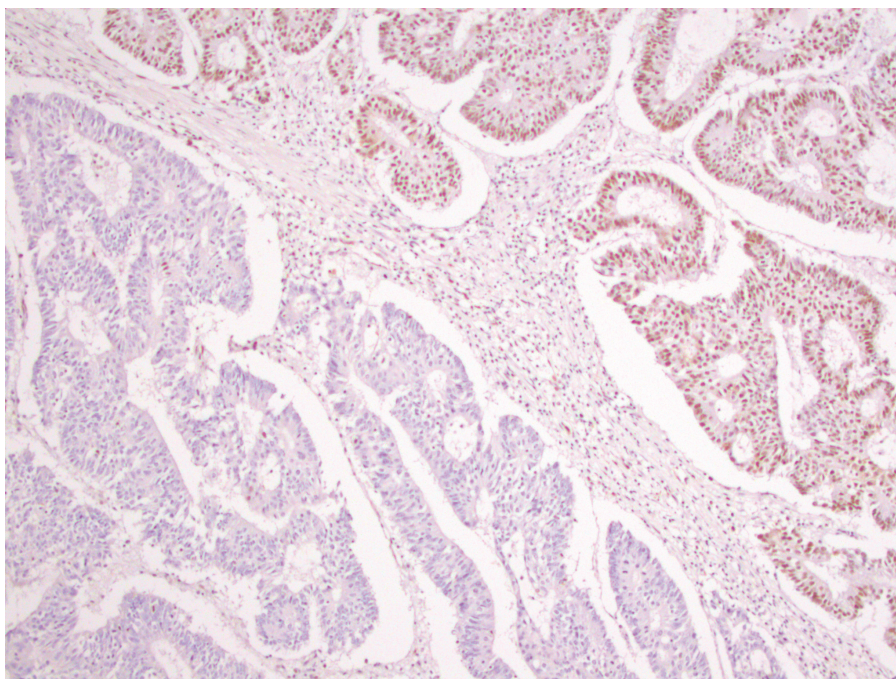
U celokupnom uzorku heterogena ekspresija MMR proteina je registrovana u dvanaest tumora. Heterogena ekspresija PMS2 proteina i heterodimernog para MLH1/PMS2 je nadjena u 2 tumora, MSH2/MSH6 u 7 tumora (od kojih su dva takođe izrazila heterogenost i za MLH1/PMS2) i MSH6 samo u 1 tumoru. U 7 od 12 tumora mikromorfološki koegzistiraju oba oblika heterogene ekspresije proteina u tumorskom tkivu, kao intraglandularna i zonalna heterogenost – Slika 5. Izolovana intraglandularna heterogena ekspresija proteina je nadjena kod dva tumora – Slika 6, dok je zonalna heterogenost prisutna u tri tumora – Slika 7.



Slika 5. Prikaz zonalne i intraglandularne mikromorfološke distribucije heterogene nuklearne ekspresije MLH1 proteina u kolorektalnom karcinomu, x100



Slika 6. Prikaz intraglandularne mikromorfološke distribucije heterogene nuklearne ekspresije MSH2 proteina u kolorektalnom karcinomu, x100



Slika 7. Mikromorfološki prikaz zonalne distribucije heterogene nuklearne ekspresije MLH1 proteina u kolorektalnom karcinomu, x100

U narednoj tabeli (Tabela 3) prikazane su demografske, kliničke i mikromorfološke karakteristike pacijenata sa kolorektalnim karcinomom u odnosu na proficijentnu, deficijentnu i heterogenu ekspresiju MMR proteina.

Table 3. Demografske, kliničke i mikromorfološke karakteristike pacijenata sa kolorektalnim karcinomom u odnosu na ekspresiju MMR proteina (proficijentni, deficijentni i heterogeni)

Karakteristike	Proficijentni MMR (n=80)		Deficijentni MMR (n=12)		Heterogeni MMR (n=12)		Ukupno (n=104)		p value
Godine starosti									
≤50	5	6.3	9	75.0	1	8.3	15	14.4	0.000
>50	75	93.8	3	25.0	11	91.7	89	85.6	
Pol									
Ženski	33	41.3	7	58.3	6	50.0	46	44.2	0.492
Muški	47	58.8	5	41.7	6	50.0	58	55.8	
Lokalizacija tumora									
Desnostrana	17	21.3	10	83.3	5	41.7	32	30.8	0.000
Levostrana	63	78.8	2	16.7	7	58.3	72	69.2	
Primenjena hemioterapija	51	63.8	11	91.7	11	91.7	73	70.2	0.032
TNM stadijum bolesti									
Stadijum III	40	50.0	7	58.3	8	66.7	55	52.9	0.516
Stadijum II	40	50.0	5	41.7	4	33.3	49	47.1	
Metastaze u regionalnim limfnim nodusima									
Prisutne	40	50.0	7	58.3	8	66.7	55	52.9	0.516
Odsutne	40	50.0	5	41.7	4	33.3	49	47.1	
Tip tumora									
Konvencionalni adenokarcinom	60	75.0	10	83.3	6	50.0	76	73.1	0.133
Mucinozni adenokarcinom	20	25.0	2	16.7	6	50.0	28	26.9	

Gradus tumora									
„High-grade“	43	53.8	9	75.0	10	83.3	62	59.6	0.077
„Low-grade“	37	46.3	3	25.0	2	16.7	42	40.4	
Sekrecija mucina									
Prisutna	22	27.5	7	58.3	6	50.0	35	33.7	0.048
Odsutna	58	72.5	5	41.7	6	50.0	69	66.3	
Peritumorska limfocitna infiltracija									
Izražena	31	38.8	8	66.7	8	66.7	47	45.2	0.055
Slabo prisutna	49	61.3	4	33.3	4	33.3	57	54.8	
„Crohn-like“ reakcija									
Pozitivna	11	13.8	8	66.7	2	16.7	21	20.2	0.000
Negativna	69	86.3	4	33.3	10	83.3	83	79.8	
Tumorsko pupljenje									
„High-grade“	16	20.0	9	75.0	1	8.3	26	25.0	0.000
„Low-grade“	64	80.0	3	25.0	11	91.7	78	75.0	
Limfovaskularna invazija									
Prisutna	39	48.8	8	66.7	10	83.3	57	54.8	0.055
Odsutna	41	51.3	4	33.3	2	16.7	47	45.2	
Perineuralno širenje									
Prisutno	37	46.3	6	50.0	6	50.0	49	47.1	0.949
Odsutno	43	53.8	6	50.0	6	50.0			

Metodom univarijantne linearne regresije izdvojeni su potencijalni prediktori ekspresije MMR proteina (proficijentni < heterogeni < deficijentni): starosna dob ispod 50 godina, prisustvo mucinske sekrecije, desnostrana lokalizacija tumora, izražena peritumorska limfocitna infiltracija, „Chron-like“ reakcija, tumorsko pupljenje i primenjena hemioterapija – Tabela 4. Multivarijantnom analizom dobijen je statistički značajan model ($F=12.297$, $p < 0.001$) koji objašnjava 39.7% varijanse ekspresije MMR. Nezavisni prediktori gubika ekspresije su mlađa životna dob ($p < 0.001$) i desnostrana lokalizacija tumora ($p < 0.01$) – Tabela 4.

Tabela 4. Univarijantna i multivarijantna regresiona analiza

Univarijantna regresiona analiza	P	B	(95% CI za B)
Godine starosti \leq 50 godina	<0.001	1.076	0.762-1.389
Ženski pol	0.238	0.159	0.107-0.424
Desnostrana lokalizacija tumora	<0.001	0.628	0.36-0.888
TNM stadijum bolesti (III)	0.394	0.114	0.151-0.379
Mucinozni adenokarcinom	0.927	0.015	0.284-0.314
Metastaze u regionalnim limfnim nodusima (prisutne)	0.394	0.114	0.151-0.379
„High-grade“ tumor	0.054	0.261	-0.005-0.527
Prisustvo mucinske sekrecije	0.015	0.340	0.067-0.613
Izražena peritumorska limfocitna infiltracija	0.024	0.300	0.040-0.560
„Crohn-like“ reakcija (pozitivna)	<0.001	0.640	0.334-0.946
Tumorsko pupljenje „high-grade“	0.001	0.513	0.223-0.802
Limfovaskularna invazija (prisutna)	0.069	0.243	0.019-0.506
Perineuralno širenje (prisutno)	0.766	0.040	0.226-0.306
Multivarijantna regresiona analiza	P	OR	(95% CI of OR)
Starost \leq 50 godina	<0.001	0.875	0.552-1.198
Prisustvo mucinske sekrecije	0.706	0.046	-0.195-0.286
Desnostrana lokalizacija tumora	0.003	0.393	0.137-0.648
Izražena peritumorska limfocitna infiltracija	0.939	-0.010	-0.264-0.245
„Crohn-like“ reakcija (pozitivna)	0.228	0.201	-0.128-0.530
Tumorsko pupljenje „high-grade“	0.704	0.054	-0.229-0.337

Metodom univarijantne binarne logističke regresije utvrđen je samo jedan statistički značajan prediktor heterogene ekspresije MMR proteina, u poređenju sa proficijentnim, sa udelom od 5.8-10.7%, prisustvo limfovaskularne invazije 5 puta ($p < 0.05$) povećava rizik od pojave heterogene ekspresije proteina – Tabela 5

Tabela 5. Univarijantna binarna logistička regresijona analiza

Univarijantna regresiona analiza	P	OR	(95% CI za OR)
Starost \leq 50 godina	0.786	1.364	0.145-12.788
Ženski pol	0.569	1.424	0.422-4.805
Desnostrana lokalizacija tumora	0.132	2.647	0.746-9.393
TNM stadijum bolesti (III)	0.288	2.000	0.557-7.177
Metastaze u regionalnim limfnim nodusima (prisutne)	0.288	2.000	0.557-7.177
Mucinozni adenokarcinom	0.082	3.000	0.869-10.363
„High-grade“ tumor	0.070	4.302	0.886-20.898
Prisustvo mucinske sekrecije	0.123	2.636	0.768-9.051
Izražena peritumorska limfocitna infiltracija	0.078	3.161	0.877-11.390
„Crohn-like“ reakcija (pozitivna)	0.787	1.255	0.242-6.507
Tumorsko pupljenje „high-grade“	0.349	0.364	0.044-3.027
Limfovaskularna invazija (prisutna)	0.040	5.256	1.082-25.525
Perineuralno širenje (prisutno)	0.808	1.162	0.345-3.913

Metodom univarijantne binarne logističke regresije izdvojeni su potencijalni prediktori deficijentnog MMR statusa, u odnosu na heterogenu ekspresiju tumora: starosna dob ispod 50 godina, desnostrana lokalizacija tumora, „Crohn-like“ reakcija i tumorsko pupljenje. Multivarijantnom analizom dobijen je statistički značajan model ($\chi^2=23.989$, $p<0.001$) koji objašnjava 63.2-84.3% varijanse ekspresije MMR proteina – Tabela 6. Međutim, nijedna od nezavisnih promjenljivih nema nezavisnu prediktivnu vrednost zbog malog uzorka.

Tabela 6. Univarijantna i multivarijantna binarna regresiona analiza

Univarijantna regresiona analiza	p	B	(95% CI za B)
Godine starosti \leq 50 godina	0.005	33.000	2.909-374.311
Ženski pol	0.682	1.400	0.279-7.016
Desnostrana lokalizacija tumora	0.045	7.000	1.044-46.949
TNM stadijum bolesti (III)	0.674	0.700	0.133-3.684
Metastaze u regionalnim limfnim nodusima (prisutne)	0.674	0.700	0.133-3.684
Mucinozni adenokarcinom	0.096	0.200	0.030-1.329
„High-grade“ tumor	0.617	0.600	0.081-4.447
Prisustvo mucinske sekrecije	0.682	1.400	0.279-7.016
Izražena peritumorska limfocitna infiltracija	1.000	1.000	0.183-5.460
„Crohn-like“ reakcija (pozitivna)	0.020	10.000	1.444-69.262
Tumorsko pupljenje „high-grade“	0.005	33.000	2.909-374.311
Limfovaskularna invazija (prisutna)	0.353	0.400	0.058-2.770
Perineuralno širenje (prisutno)	1.000	1.000	0.202-4.955
Multivarijantna regresiona analiza	p	OR	(95% CI of OR)
Starost \leq 50 godina	0.997	9.863x10 ¹⁵	
Desnostrana lokalizacija tumora	0.997	6.014x10 ¹⁵	
„Crohn-like“ reakcija (pozitivna)	0.998	120003272.9	
Tumorsko pupljenje „high-grade“	0.997	196797989.8	

Pacijenti su praćeni približno 2 godine (22.43 ± 6.66 meseci). Za to vreme je preminuo 21 pacijent (20.20%), a recidiva je bilo kod 14 pacijenata (13.50%).

Demografske, patohistološke i kliničke karakteristike tumora u odnosu na pojavu recidiva predstavljene su u tabeli 7. Relapsi su bili češći kod pacijenata sa izraženom peritumorskom limfocitnom infiltracijom ($p < 0.05$) i u grupi tumora sa visokim histološkim gradusom ($p < 0.05$)

Tabela 7. Demografske, patohistološke i kliničke karakteristike tumora u odnosu na pojavu recidiva

Karakteristike	Relaps	Bez Relapsa	<i>p</i> Value
Godine starosti	70.0 (62.8–73.2)	66.0 (54.0–71.2)	1.364 (0.172)
Ženski pol	6 (42.9%)	52 (57.8%)	0.572 (0.388)
Desnostrana lokalizacija tumora	7 (50.0%)	25 (27.8%)	1.862 (0.121)
Primenjena hemioterapija	11 (78.6%)	62 (68.9%)	0.179 (0.547)
TNM stadijum (III)	10 (71.4%)	45 (50.0%)	1.456 (0.160)
Konvencionalni adenokarcinom	8 (57.1%)	68 (75.6%)	1.257 (0.195)
Gradus tumora „high-grade“	12 (85.7%)	50 (55.6%)	3.410 (0.041)
Prisutna mucinska sekrecija	7 (50.0%)	28 (31.1%)	1.182 (0.224)
„Crohn-like“ reakcija (pozitivna)	4 (28.6%)	17 (18.9%)	0.232 (0.474)
„High-grade“ tumorsko pupljenje	5 (35.7%)	21 (23.3%)	0.440 (0.332)
Prisutna limfovaskularna invazija	8 (57.1%)	49 (54.4%)	0.000 (1.000)
Prisutna perineuralna invazija	7 (50.0%)	42 (46.7%)	0.000 (1.000)
MMR status (proficijentni vs deficijentni)	12 (85.7%)	80 (88.9%)	0.000 (0.663)
Proficijentni MMR status	12 (85.7%)	80 (88.9%)	2.163 (0.706)
Gubitak MLH1/PMS2 proteina	2 (14.3%)	5 (5.6%)	
Gubitak PMS2 proteina	0 (0.0%)	3 (3.3%)	
Gubitak MSH2/MSH6 proteina	0 (0.0%)	1 (1.1%)	
Gubitak MSH6 proteina	0 (0.0%)	1 (1.1%)	

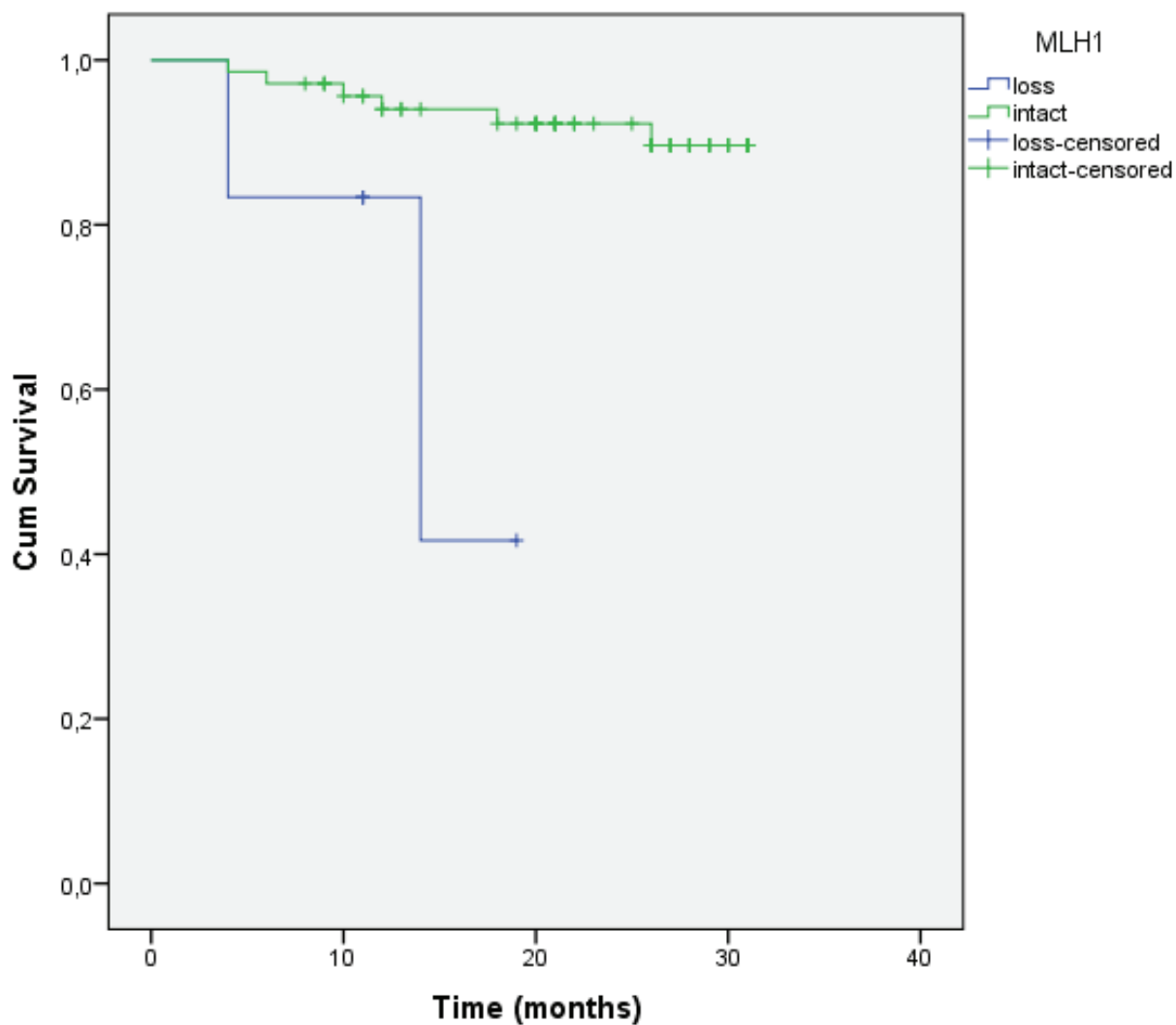
Koristeći univarijantnu Cox-regresionu analizu identifikovali smo moguće prediktore preživljavanja bez bolesti: prisustvo izražene peritumorske limfocitne infiltracije i visok histološki gradus tumora. U multivarijantnom modelu ($\chi^2 = 8.426$, $p < 0.05$), nijedna od promenljivih nije pokazana kao nezavisni prediktor preživljavanja bez bolesti (Tabela 8).

Tabela 8. Cox-regresiona analiza preživljavanja bez bolesti

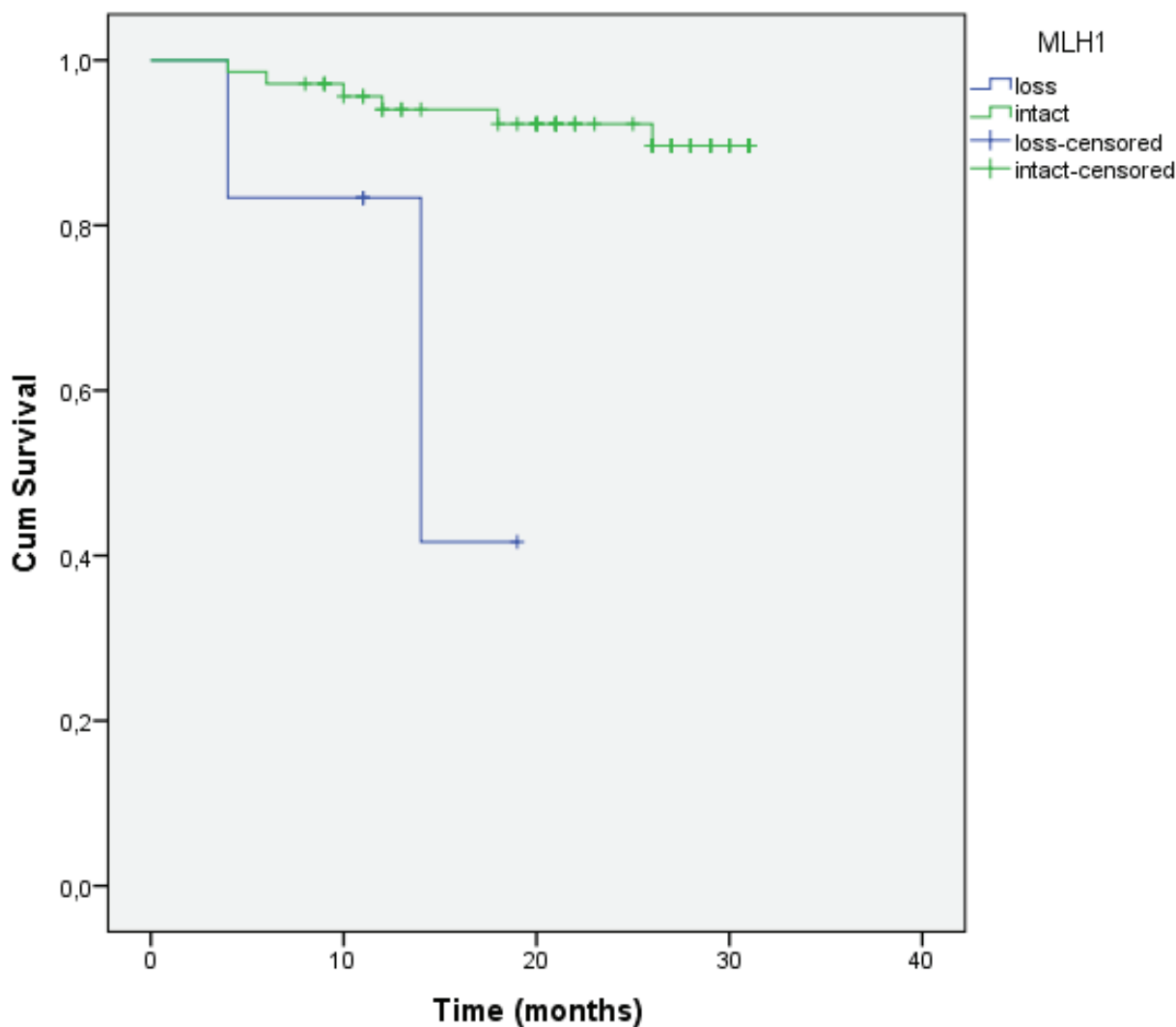
Karakteristike	Univarijantna regresiona analiza		Multivarijantna	
	HR (95% CI for HR)	p	HR (95% CI for HR)	P
Izražena peritumorska limfocitna infiltracija	4.187 (1.303-13.452)	0.016	2.611 (0.716-9.526)	0.146
„High-grade“ tumor	4.914 (1.098-21.992)	0.037	2.935 (0.556-15.499)	0.205

Hazard ratio, HR; Confidence interval CI

Pokazalo se da MMR status (deficijentni i proficijentni) nije značajan prediktor preživljavanja bez bolesti. S druge strane, kod pacijenata sa konvencionalnim adenokarcinomom, intaktna ekspresija MLH1 proteina je bila značajan prediktor dužeg preživljavanja bez bolesti ($p < 0.01$) (Slika 8). Proficijentna ekspresija MMR proteina je kod karcinoma bez sekrecije mucina bila prediktor dužeg preživljavanja bez bolesti u poređenju sa bilo kojim gubitkom ekspresije MMR proteina ($p < 0.05$), posebno sa gubitkom ekspresije heterodimernog para MLH1/PMS2 ($p < 0.01$) – Slika 9.

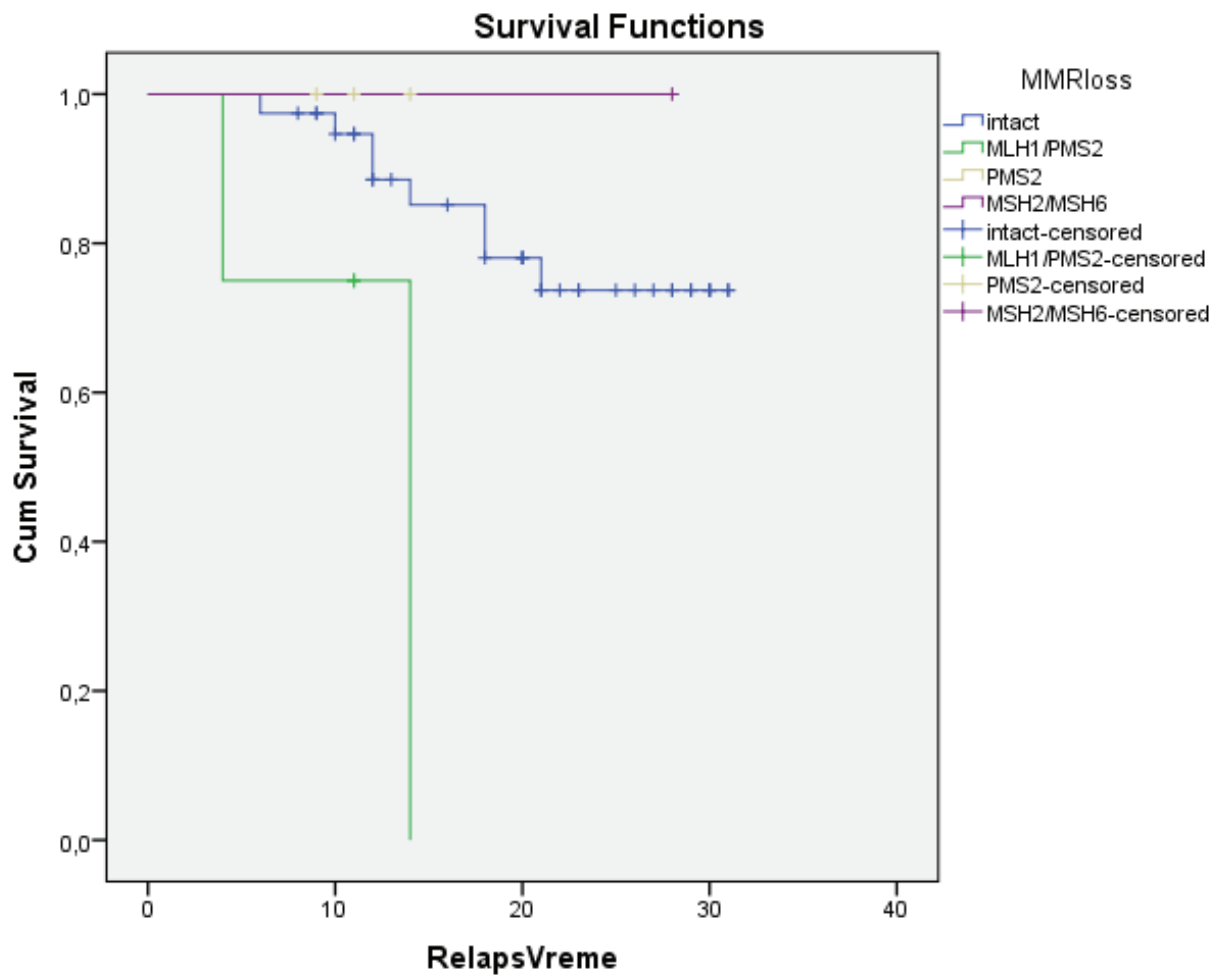


Slika 8. Kaplan-Meier kriva preživljavanja bez bolesti u odnosu na MLH1 status (deficijentna ili proficijentna ekspresija MLH1 proteina) kod pacijenata sa konvencionalnim adenokarcinomom

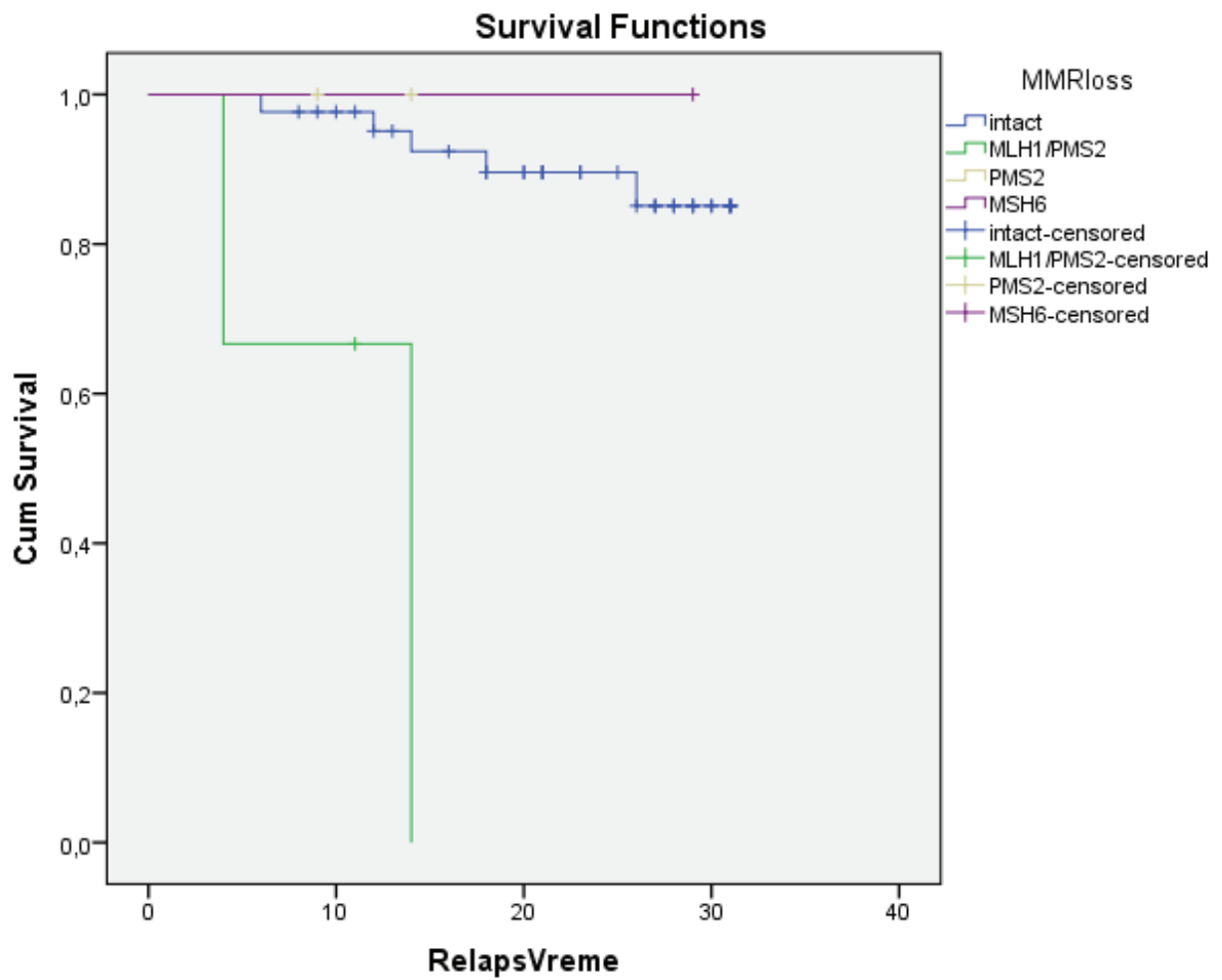


Slika 9. Kaplan-Meier kriva preživljavanja bez bolesti u odnosu na MMR status (deficijentna ili proficijentna ekspresija MMR proteina) kod pacijenata sa adenokarcinomom bez sekrecije mucina

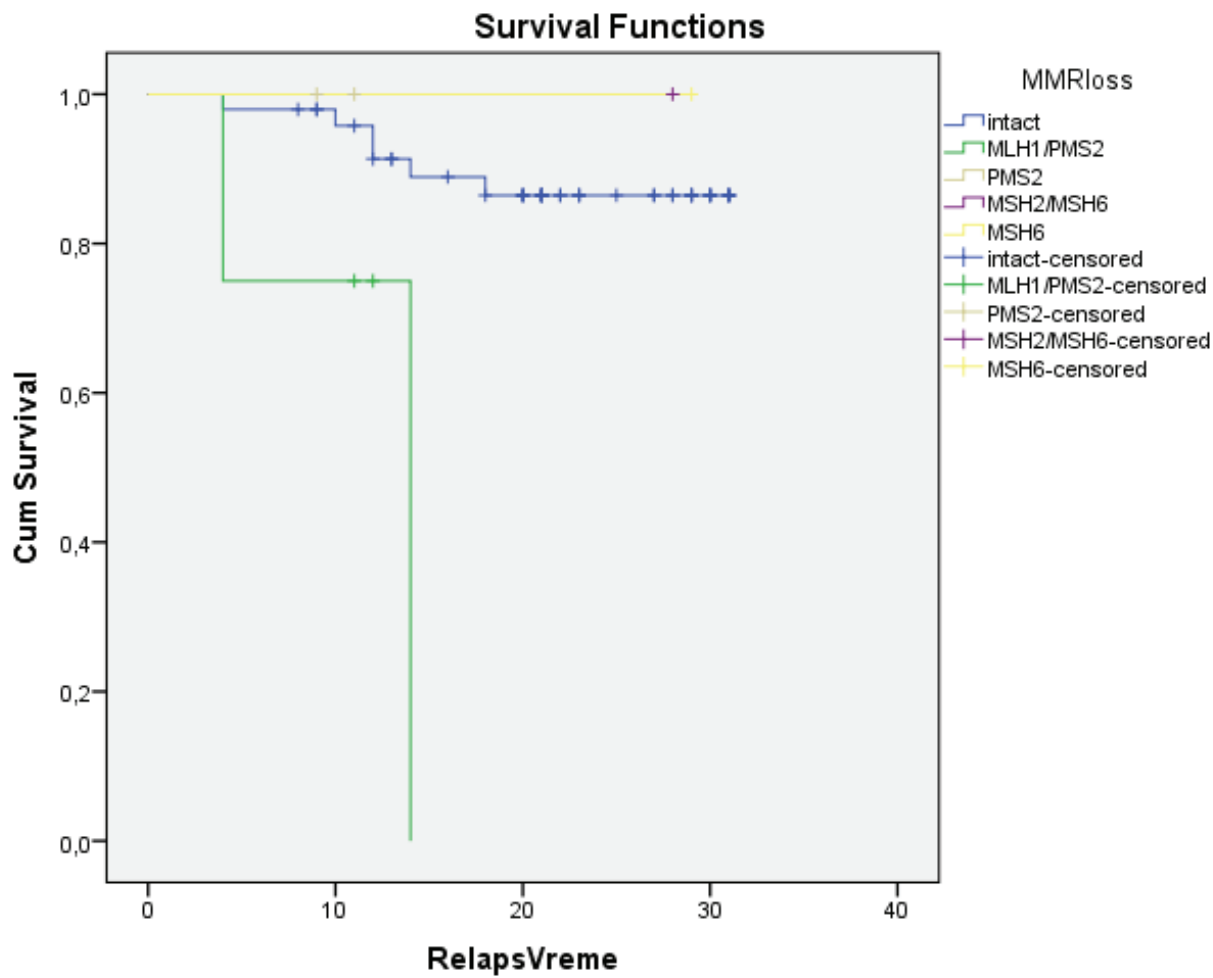
Sa druge strane, gubitak ekspresije heterodimernog para MLH1/PMS2, u poređenju sa intaktnom ekspresijom sva četiri MMR proteina, povezan je sa kraćim preživljavanjem bez bolesti kod pacijenata sa izraženom peritumorskom limfocitnom infiltracijom ($p < 0.05$) - Slika 10, kao i kod pacijenata sa limfovaskularnom invazijom ($p < 0.05$) - Slika 11, perineuralnom invazijom ($p < 0.01$) - Slika 12, III stadijumom bolesti ($p < 0.05$) - Slika 13, visokim histološkim gradusom tumora ($p < 0.05$) - Slika 14 i pozitivnom „Crohn-like“ reakcijom ($p < 0.05$) - Slika 15.



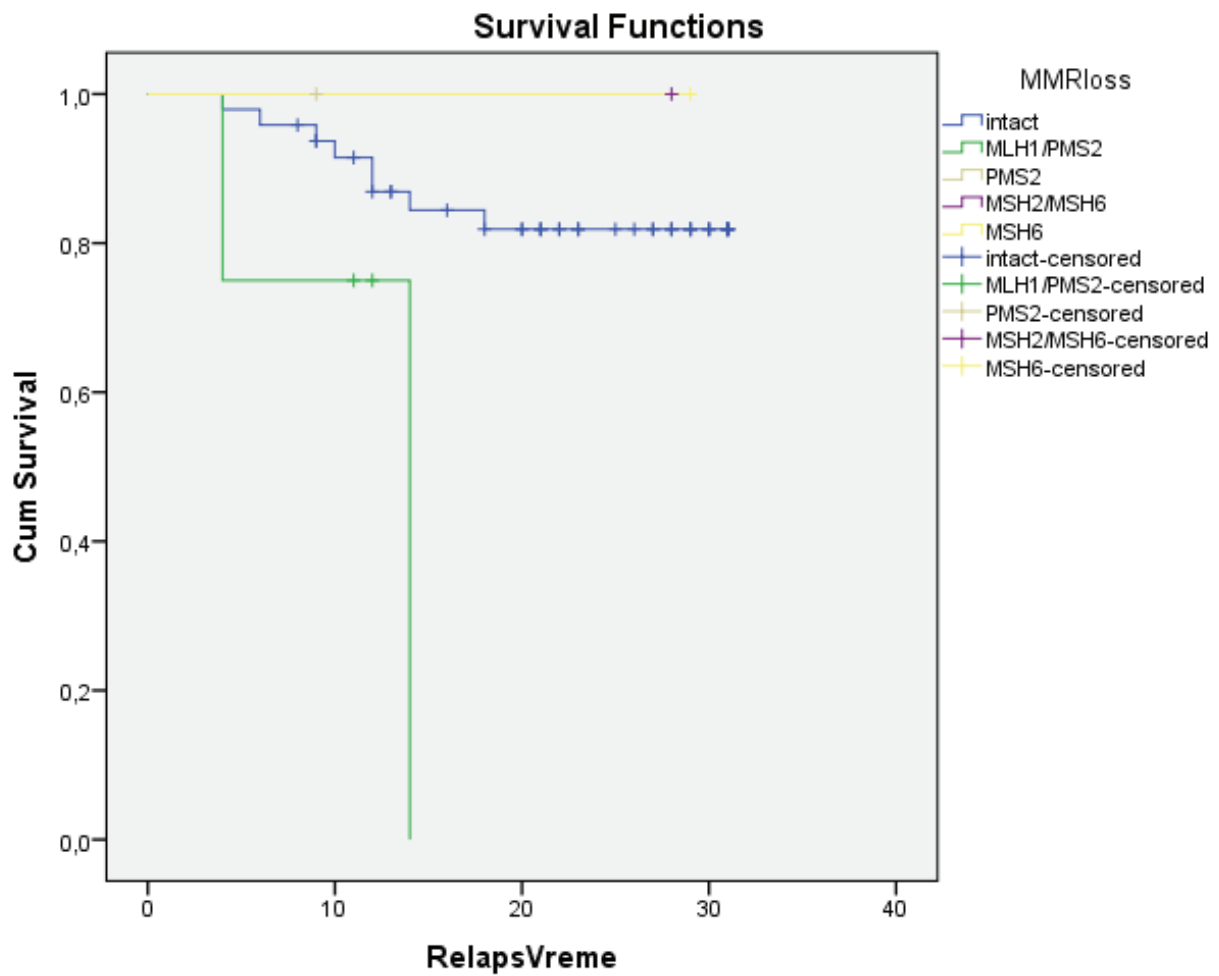
Slika 10. Kaplan-Meier kriva preživljavanja bez bolesti u odnosu na MMR status (deficijentna ili proficijentna ekspresija MMR proteina) kod pacijenata sa izraženom peritumorskom limfocitnom infiltracijom



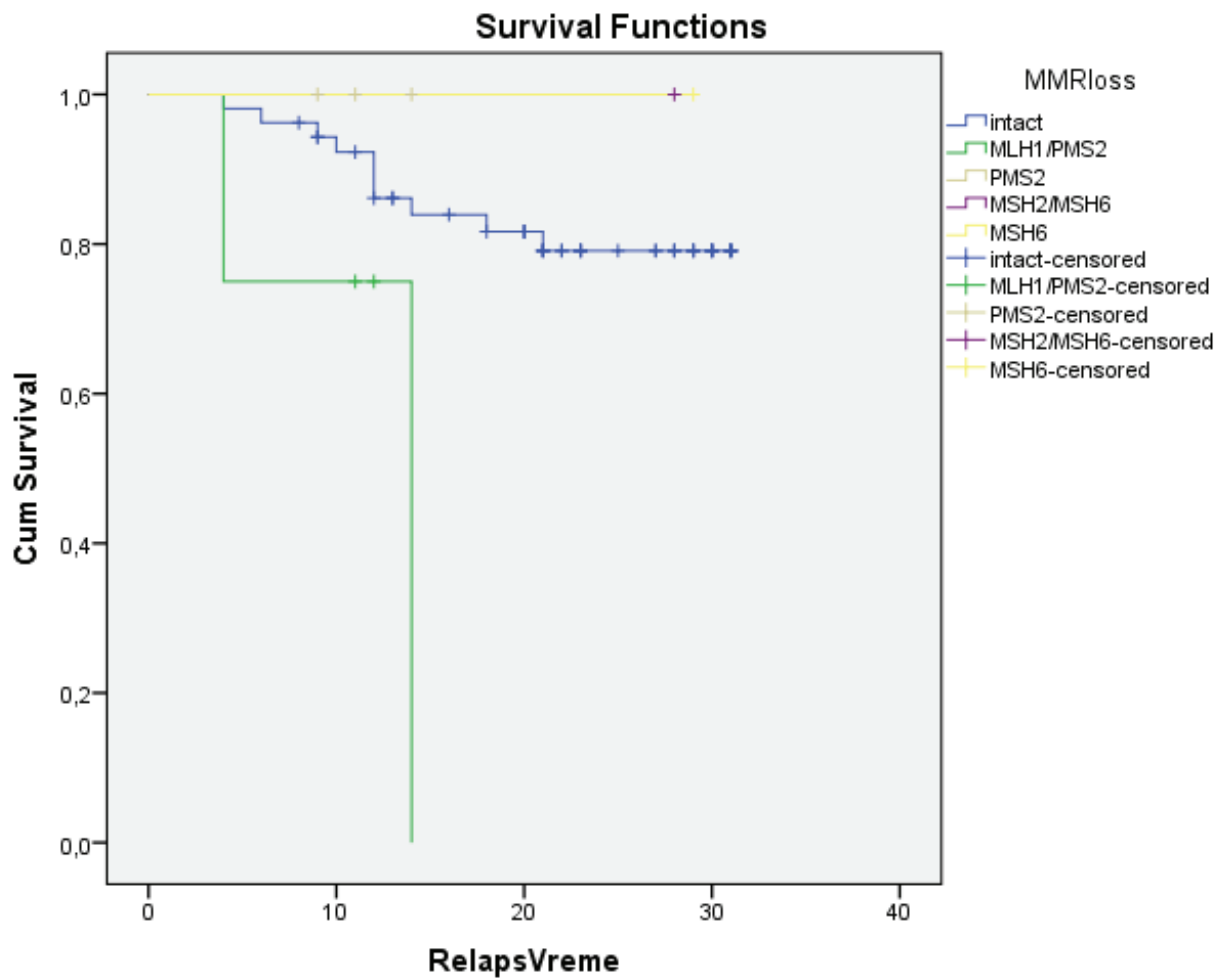
Slika 11. Kaplan-Meier kriva preživljavanja bez bolesti u odnosu na MMR status (deficijentna ili proficijentna ekspresija MMR proteina) kod pacijenata sa limfovaskularnom invazijom



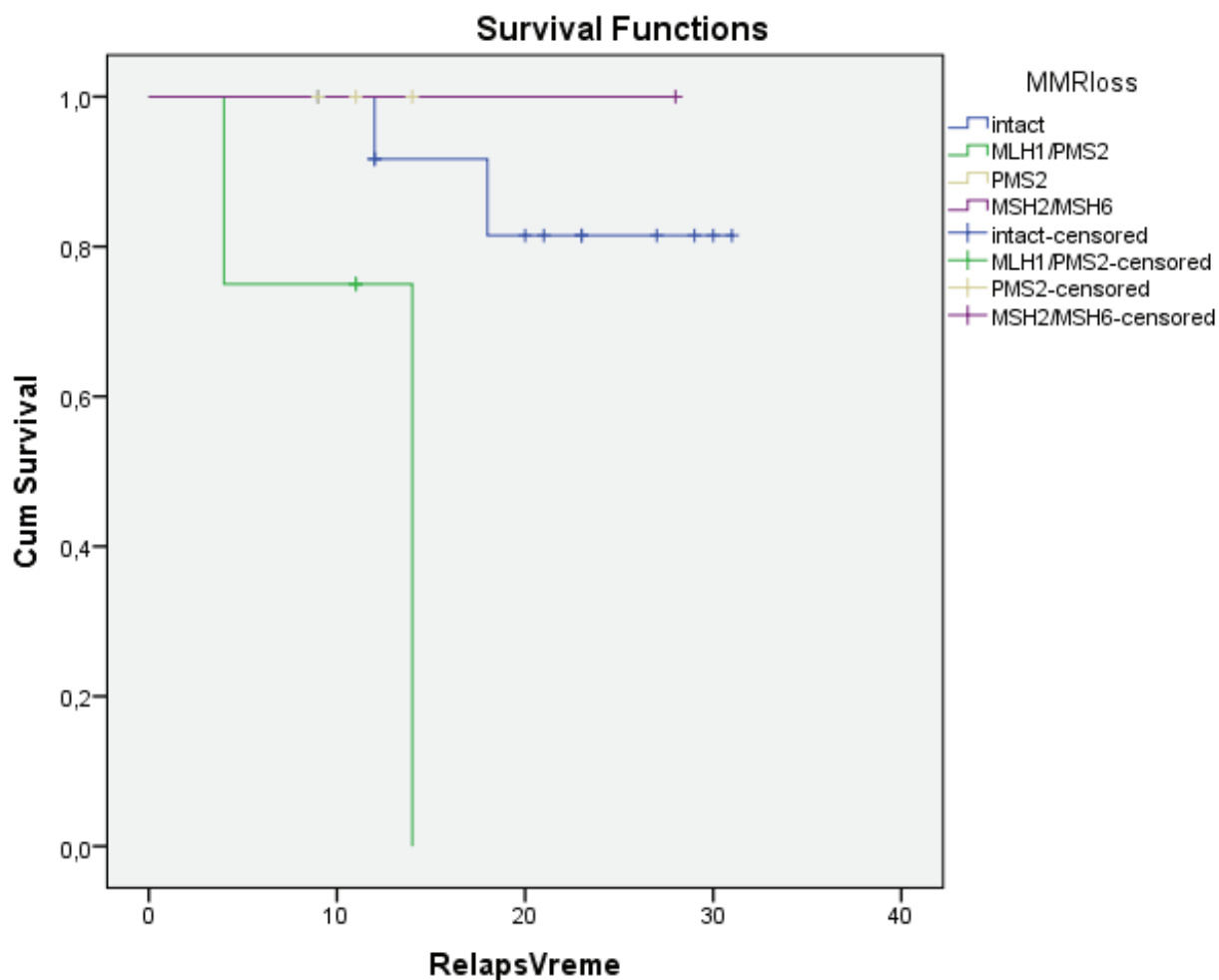
Slika 12. Kaplan-Meier kriva preživljavanja bez bolesti u odnosu na MMR status (deficijentna ili proficijentna ekspresija MMR proteina) kod pacijenata sa perineuralnom invazijom



Slika 13. Kaplan-Meier kriva preživljavanja bez bolesti u odnosu na MMR status (deficijentna ili proficijentna ekspresija MMR proteina) kod pacijenata sa adenokarcinomom u III stadijumu bolesti



Slika 14. Kaplan-Meier kriva preživljavanja bez bolesti u odnosu na MMR status (deficijentna ili proficijentna ekspresija MMR proteina) kod pacijenata sa visokim histološkim gradusom tumora



Slika 15. Kaplan-Meier kriva preživljavanja bez bolesti u odnosu na MMR status (deficijentna ili proficijentna ekspresija MMR proteina) kod pacijenata sa pozitivnom „Crohn-like“ reakcijom

U narednoj tabeli smo prikazali demografske, kliničke i patohistološke karakteristike pacijenata i tumora u odnosu na ukupno preživljavanje (Tabela 9). Ukupno preživljavanje je povezano sa mucinoznim adenokarcinomom ($p < 0.05$), metastazama u regionalnim limfnim nodusima ($p < 0.05$), III stadijumom bolesti ($p < 0.05$), visokim histološkim gradusom tumora ($p < 0.001$) i prethodnim relapsom ($p < 0.001$).

Tabela 9. Demografske, kliničke i patohistološke karakteristike pacijenata i tumora u odnosu na ukupno preživljavanje

Karakteristike	Smrtni ishod	Bez smrtnog ishoda	<i>p</i> Value
Godine starosti	70.0 (62.8–73.2)	66.0 (54.0–71.2)	1.364 (0.172)
Muški pol	11 (52.4%)	47 (56.6%)	0.011 (0.808)
Lokalizacija tumora (desnostrana)	9 (42.9%)	23 (27.7%)	1.164 (0.195)
Primenjena hemioterapija na bazi 5-FU	18 (85.7%)	55 (66.3%)	2.172 (0.110)
Relapsi	8 (38.1%)	6 (7.2%)	11.185 (0.001)
TNM stadijum bolesti (III)	16 (76.2%)	39 (47.0%)	4.624 (0.026)
Histološki tip tumora (adenokarcinom)	11 (52.4%)	65 (78.3%)	4.486 (0.026)
Gradus tumora („high-grade“)	19 (90.5%)	43 (51.8%)	8.865 (0.001)
Prisutna mucinska sekrecija	10 (47.6%)	25 (30.1%)	1.581 (0.195)
„Crohn-like“ reakcija (pozitivna)	4 (19.0%)	17 (20.5%)	0.000 (1.000)
„High-grade“ tumorsko pupljenje	3 (14.3%)	23 (27.7%)	0.975 (0.266)
Prisustvo limfovaskularne invazije	15 (71.4%)	42 (50.6%)	2.154 (0.140)
Prisustvo perineuralne invazije	14 (66.7%)	35 (42.2%)	3.113 (0.053)
MMR status (proficijentni vs. deficijentni)	20 (95.2%)	72 (86.7%)	0.498 (0.452)
Proficijentni MMR status	20 (95.2%)	72 (86.7%)	1.553 (0.817)
Gubitak MLH1/PMS2 proteina	1 (4.8%)	6 (7.2%)	
Gubitak PMS2 proteina	0 (0.0%)	3 (3.6%)	
Gubitak MSH2/MSH6 proteina	0 (0.0%)	1 (1.2%)	
Gubitak MSH6 proteina	0 (0.0%)	1 (1.2%)	

Iako su univarijantnom Cox-regresijskom analizom identifikovani brojni mogući prediktori ukupnog preživljavanja u ispitivanoj grupi, jedini nezavisni prediktori u multivarijantnom modelu ($\chi^2 = 27.196$, $p < 0.001$) bili su starija životna dob pacijenata ($p < 0.05$) i visok histološki gradus tumora ($p < 0.05$) (Tabela 10).

Tabela 10. Cox-regresiona analiza ukupnog preživljavanja

Karakteristike	Univariate		Multivariate	
	HR (95% CI for HR)	<i>p</i>	HR (95% CI for HR)	<i>P</i>
Godine starosti	1.095 (1.014–1.184)	0.021	1.104 (1.013–1.204)	0.026
TNM stadijum bolesti (III)	3.068 (1.123–8.381)	0.029	0.789 (0.224–2.776)	0.711
Relapsi (prisutni)	5.395 (2.207–13.189)	0.000	2.678 (0.983–7.294)	0.054
Gradus tumora („high-grade“)	7.575 (1.764–32.532)	0.006	7.637 (1.163–50.162)	0.034

Pre nekoliko decenija, kolorektalni karcinom se retko dijagnostikovao i duži niz godina predstavlja značajan globalni zdravstveni problem. Sveukupno, kolorektalni karcinom je na trećem mestu po incidenci, ali na drugom mestu po stopi smrtnosti. Najveća stopa incidence kolorektalnog karcinoma kod oba pola je u zemljama Zapadne Evrope, u Australiji/Novom Zelandu, Severnoj Americi i Istočnoj Aziji. Niske stope incidence su prisutne u većini regiona Afrike i Južne Azije. U zemljama Južne i Centralne Evrope i u Aziji je registrovan najveći porast mortaliteta, dok je stopa mortaliteta u padu u Sjedinjenim Američkim Državama zahvaljujući boljem programu skrininga i razvojem endoskopskih procedura (Ferlay J et al., 2019; Bray F et al., 2018). Prema podacima Globocan-a, Republika Srbija se nalazi u grupi zemalja Evrope sa srednje visokim stopama mortaliteta od kolorektalnog karcinoma. U odnosu na ostale evropske zemlje, Republika Srbija se nalazi na devetnaestom mestu u odnosu na incidencu kod muškaraca i na dvadesetom mestu u odnosu na incidencu kod žena.

Genetski faktori kao i faktori spoljne sredine igraju važnu ulogu u nastanku kolorektalnog karcinoma. Pored starenja stanovništva, pozitivne familijarne anamneze i načina ishrane u zemljama sa visokim ekonomskim standardom, nepovoljni faktori rizika kao što su: gojaznost, nedostatak fizičke aktivnosti, dijabetes melitus, pušenje cigareta i povećan unos alkohola povećavaju rizik od nastanka karcinoma debelog creva i rektuma (Kirkegaard H et al., 2010; Huxley RR et al., 2009; Jaspersen KW et al., 2010; Mayer Ret al., 2016; Durko L et al., 2014).

U ovoj studiji je ispitivan deficit MMR-a pomoću imunohistohemijske metode korišćenjem panela od četiri antitela (MLH1, MSH2, PMS2, MSH6). Određivanje deficita MMR-a pomoću imunohistohemijske metode je od velikog značaja. Deficit MMR-a može se odrediti pomoću različitih metoda. Neke od metoda određivanja mikrosatelitske nestabilnosti su imunohistohemijska analiza MMR proteina bazirana na presecima parafinskih tumorskih blokova i analiza na bazi polimerazne lančane reakcije kapilarnom elektroforezom. Zlatni standard za otkrivanje MSI je genetsko testiranje, međutim CAP preporučuje inicijalno određivanje deficita MMR-a pomoću imunohistohemijske analize korišćenjem panela od četiri antitela uključujući: MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2.

Obe ove metode su komplementarne, ali pružaju različite informacije. MSI testiranje traje nešto duže i košta više od IHC tehnike i ne daje informacije o tome koji MMR gen ima nedostatak. Za oba mikrosatelitska markera BAT-25 i BAT-26 zabeleženi su polimorfizmi, posebno kod afričkih etničkih grupa. Interpretacija mikrosatelitske nestabilnosti zahteva obučene molekularne biologe, posebno da bi se izbeglo pogrešno tumačenje. Sa druge strane, IHC analiza je jednostavna, brza, jeftina i dostupna metoda procene ekspresije MMR proteina u tumorskom tkivu, za koju smo se i mi u ovoj studiji opredelili. Specifičnost metode je skoro 100%, a senzitivnost je oko 90% zbog postojanja missence mutacija MMR gena, tako da enzim postoji ali je nefunkcionalan, a imuno-reaktivnost se registruje (Lynch HT et al., 2009; Lynch HT et al., 2007; Shia J et al., 2008; de La Chapelle A, 2002; Hampel H et al 2008; Overbeek LI et al., 2008). Veliku studiju izveli su Cicek i saradnici 2011. godine, kada je analizirano oko 6 000 kolorektalnih karcinoma. Studija je pokazala 90–95% podudarnosti između onih slučajeva koje je MSI test identifikovao kao dMMR i onih koje su otkrivene pomoću imunohistohemijske analize (Cicek MS et al., 2011).

Naša studija je otkrila 12% pacijenata sa deficitom MMR-a u celokupnom uzorku. Potvrđeno je da se učestalost gubitka ekspresije proteina prilično razlikuje u različitim studijama. Tumori sa dMMR činili su 34% ukupnog uzorka u populaciji Pakistana (Hashmi AA et al., 2017), 21% u Singapuru (Chev M et al., 2013), približno 15% u studijama zapadnih zemalja (Guastadisegni C et al., 2010), u Sjedinjenim Američkim Državama 10.7% (Pearlman R et al., 2017) i u Japanu 8.4% (Suzuki O et al., 2017). U našoj studiji je otkriveno da je obrazac gubitka nuklearne ekspresije deficitarnih MMR tumora promenljiv. Najčešći obrazac deficita MMR-a je gubitak ekspresije proteina heterodimernih parova MLH1/PMS2 registrovan u 7 slučajeva, dok je drugi najčešći obrazac nuklearne IHC ekspresije bio izolovani gubitak ekspresije PMS2 proteina kod 3 pacijenta. Gubitak nuklearne ekspresije heterodimernog para MSH2/MSH6 utvrđen je kod jednog pacijenta, kao i izolovan gubitak ekspresije MSH6 proteina. Ove frekvencije u pogledu kombinovanog gubitka MMR proteina u saglasnosti su sa studijama sprovedenim na populaciji bolesnika iz Pakistana i Šangaja (Hashmi AA et al., 2017; Yuan L et al., 2015). U našoj studiji nije registrovan izolovani gubitak ekspresije MLH1 i MSH2 proteina. Rezultat je u skladu sa molekularnim karakteristikama proteina koji učestvuju u popravljanju grešaka nastalih u toku replikacije ćelija (Aaltonen L et al., 1993).

Molekularni fenotip kolorektalnog karcinoma usko je povezan sa njegovim kliničkim i patološkim karakteristikama, biološkim ponašanjem, prognozom i odgovorom na terapiju, kako u sporadičnom tako i u hereditarnom nepolipoznom kolorektalnom karcinomu i Linč sindromu. Dakle, veoma je važno prepoznati kolorektalne karcinome sa različitim demografskim, kliničkim, mikromorfološkim i molekularnim karakteristikama (Battaglin F et al., 2018). Povezanost demografskih, kliničkih, mikromorfoloških karakteristika tumora i različitog MMR statusa (proficijentnog i deficijentnog) pokazala je da karcinome sa deficitom MMR-a karakterišu specifične demografske, kliničke i histopatološke osobine. Prethodne studije (Raut C et al., 2004; Kavakami H et al, 2015; Hashmi AA et al., 2017) pokazale su različite osobine dMMR tumora, kao što su: ženski pol, mlađi

pacijenti, loša diferencijacija tumora, prisustvo vanćelijskih i intraćelijskih mucina, proksimalna lokalizacija debelog creva, „Crohn-like“, reakcija i izražena limfocitna infiltracija u okolini tumorske mase. Sinicrope i saradnici su utvrdili povezanost MSI fenotipa sa nekoliko kliničkopatoloških karakteristika. Pružili su dokaze o povezanosti proksimalne lokalizacije primarnog karcinoma, visokog histološkog gradusa tumora, mucinoznog adenokarcinoma, ranog patološkog stadijuma bolesti i prisustva mutacije BRAF onkogeno sa mikrosatelitski nestabilnim karcinomima (Sinicrope FA et al., 2006).

Naša studija je pokazala da je u grupi sa gubitkom nuklearne imunohistohemijske ekspresije MMR proteina bilo više pacijenata mlađih od 50 godina (75.00%), dok je intaktna imunohistohemijska ekspresija MMR proteina bila uobičajena za pacijenate starije od 50 godina (93.48%). Statistički značajna povezanost između mlađeg životnog doba pacijenata i gubitka nuklearne ekspresije MMR proteina u našoj studiji je bila evidentna, što je u skladu sa literaturnim podacima (Suzuki O et al., 2017; Kim H et al., 1994; Raut C et al., 2004).

Desnostrani karcinomi kolona u našem istraživanju su u velikoj meri (83,33%) i statistički značajno povezani sa deficitarnim MMR tumorima. Tumori sa dMMR-om su češće lokalizovani na desnoj strani debelog creva u poređenju sa levostranom anatomskom lokalizacijom i lokalizacijom u rektumu (Thibodeau SN et al., 1993; Kim H et al., 1994; Boland C et al., 1998; Raut C et al., 2004; Kavakami H et al., 2015; Hashmi AA et al., 2017).

Deficijentni MMR tumori su znatno češći kod osoba ženskog pola u poređenju sa muškim polom (Raut C et al., 2004). U našoj studiji, znatno veći broj pacijentkinja je imao CRC sa deficitom MMR-a (58.33% slučajeva), u poređenju sa osobama muškog pola.

Predhodne studije su pokazale da su mucinozni kolorektalni karcinomi statistički značajno povezani sa mikrosatelitski nestabilnim tumorima u odnosu na konvencionalni adenokarcinom (Kim H et al., 1994; Boland C et al., 1998; Raut C et al., 2004; Andrici J et al., 2016). U našoj studiji preovladavao je konvencionalni adenokarcinom (73,08%), u poređenju sa mucinoznim adenokarcinomom (26,92%). Od tumora sa gubitkom ekspresije MMR proteina bilo je 16.67% mucinoznih i 83.33% konvencionalnih adenokarcinoma. Sekrecija mucina registrovana je kod 35 pacijenata sa adenokarcinomom. Tumori sa deficitarnim MMR statusom, bilo da je reč o konvencionalnom ili mucinoznom adenokarcinomu, pokazali su prisustvo evidentne sekrecije mucina (58.33%), međutim bez statističke značajnosti.

Mnoge studije su pokazale da se deficijentni MMR kolorektalni karcinomi češće javljaju kod slabo diferentovanih tumora (Kim H et al., 1994; Boland C et al., 1998; Raut C et al., 2004; Rosti C et al., 2014; Kavakami H i sar., 2015). U četrdeset i dva slučaja u našoj studiji pronađen je dobro diferentovan konvencionalni adenokarcinom (niskog histološkog gradusa), dok je tumor visokog

gradusa bio prisutan kod 62 pacijenata. Među adenokarcinomima visokog histološkog gradusa bilo je 75% dMMR tumora, a kod adenokarcinoma niskog gradusa 25% tumora.

Mikrosatelitska nestabilnost može dovesti do proizvodnje abnormalnih proteina koji bi, delujući kao neo-antigeni, mogli da indukuju adaptivni imunološki odgovor efikasan u ograničavanju rasta i/ili širenja tumora (Linnebacher M et al., 2001). Ipak, antitumorski imuni odgovor je složen, što uključuje interakciju nekoliko tipova ćelija i ćelijskih proizvoda kako adaptivnog tako i urođenog imunog sistema (Titu LV et al., 2002). S druge strane, kolorektalni tumori mogu da izbegnu imunološki nadzor koristeći nekoliko strategija (Evans C et al., 2006).

Graham i Appelman su prvi opisali „Crohn-like„ reakciju na Univerzitetu u Mičigenu 1990. godine i utvrdili da je povezana sa boljim preživljavanjem. Reakcija je opisana kao prisustvo limfoidnih agregata, neki sa germinativnim centrima, koji se uglavnom nalaze u muskularis propriji i perikoličnom masnom tkivu prema invazivnom frontu tumora. Pokazalo se da kod tumora sa deficitom MMR sistema odnosno kod MSI tumora broj imunih ćelija se u njihovoj mikrookolini povećava, a i „Crohn-like„ reakcija je češće prisutna ka invazivnom frontu tumorske mase (Kim H et al., 1994; Boland C et al., 1998). Takođe, postoje dokazi koji povezuju „Crohn-like„ reakciju sa boljim preživljavanjem. Istraživanje od strane Vayrynen i saradnika je pokazalo da je ova reakcija povezana sa intratumorskom gustinom T-ćelija, kao i sa preživljavanjem nezavisno od patološkog stadijuma, peritumorske limfocitne infiltracije i TIL-a (Vayrynen JP et al., 2014). Druga studija Ogina i saradnika je pokazala da je peritumorska limfocitna reakcija (koja uključuje „Crohn-like„ reakciju, peritumorsku limfocitnu reakciju bez formiranja limfnih folikula i tumor infiltrišuće limfocite) povezana sa statistički značajnim poboljšanjem ukupnog preživljavanja. Međutim, kada su razmatrali svaku komponentu rezultata posebno, primetili su statistički značajnu prednost preživljavanja za „Crohn-like„ reakciju, ali ne i za tumor infiltrišuće limfocite (Ogino S et al., 2009).

Pozitivna „Crohn-like„ reakcija zabeležena je kod 21 pacijenta, 66.67% tumora pokazalo je gubitak ekspresije barem jednog MMR proteina. U našoj studiji tumori sa dMMR bili su značajno povezani sa prisustvom „Crohn-like„ reakcije u okolini tumorske mase. Statistički značajna povezanost između tumora sa dMMR-om i izraženom peritumorskom limfocitnom infiltracijom je nađena u mnogim studijama (Kim H et al., 1994; Boland C et al., 1998; Raut C et al., 2004). Međutim, u našem materijalu povezanost deficitarnih MMR tumora i izražene peritumorske limfocitne infiltracije bez formiranja limfnih folikula u okolini tumorske mase nije imala statističku značajnost.

Iako određivanje patološkog stadijuma tumora ostaje ključna odrednica prognoze i lečenja CRC-a, ipak postoji značajna varijabilnost u kliničkom ishodu kod pacijenata u istom stadijumu bolesti. Ova varijabilnost može biti rezultat molekularne heterogenosti tumora (Kawakami H et al., 2015). S obzirom na to, potrebna je identifikacija molekularnih markera u cilju personalizovanog lečenja kolorektalnog karcinoma (Sinicrope FA et al., 2016). Molekularni markeri biološkog ponašanja i

prognoze kolorektalnog karcinoma su detaljno proučavani, gde mikrosatelitska nestabilnost ima ključnu ulogu u razvoju, prognostičkom i prediktivnom značaju karcinoma (Gelsomino F et al., 2016). Sepulveda i saradnici su pružili dokaze da je određivanje deficitarnog MMR statusa jedan od takvih kandidata (Sepulveda AR et al., 2017). Prepoznavanje karcinoma sa poremećajem funkcionisanja MMR sistema (deficijentni ili proficijentni MMR) postaje sve važnije (Buza N et al., 2016). Deficit funkcionisanja MMR sistema kolorektalnom karcinomu pruža korisne prognostičke informacije, pokazujući da pacijenti sa mikrosatelitski nestabilnim karcinomima imaju bolju opštu stopu preživljavanja i modifikovani odgovor na konvencionalnu hemioterapiju (Elsaleh H et al., 2000; Elsaleh H et al., 2001).

Kada je mikrosatelitska nestabilnost prvi put identifikovana kod pacijenata sa CRC-om, primećeno je da su pacijenti sa MSI tumorima imali bolju opštu stopu preživljavanja u poređenju sa onima koji su bili mikrosatelitski stabilni (Thibodeau SN et al., 1993). Štaviše, utvrđeno je da se pacijenti sa MSI tumorima nalaze u nižem patološkom stadijumu bolesti prilikom dijagnoze, a manji procenat pacijenata je imao metastatsku bolest. Od inicijalnog otkrića mikrosatelitske nestabilnosti u CRC-u sakupili su se značajni podaci koji pokazuju bolji ishod pacijenata sa dMMR-om u poređenju sa pacijentima koji imaju pMMR tumore. Ovi podaci su u velikoj meri iz retrospektivnih studija, (Sinicrope FA et al., 2006; Gafà R et al., 2000; Halling KC et al., 1999; Lanza G et al., 2006), ali takođe uključuju i populacionu studiju (Samowitz WS et al., 2001) kao i meta-analizu (Popat S et al., 2005). U ovim studijama pacijenti sa dMMR tumorima su imali bolju opštu stopu preživljavanja u poređenju sa pacijentima iz grupe sa proficijentnim MMR-om. Meta-analiza je obuhvatila 32 studije na 1.277 pacijenata sa dMMR kolorektalnim karcinomima. Ova meta-analiza je pokazala smanjenje rizika od smrti za 35% kod pacijenata sa dMMR tumorima u poređenju sa pMMR tumorima. Analizirane studije su obuhvatile nelečene pacijente kao i pacijente lečene adjuvantnom hemioterapijom na bazi 5-FU. Prospektivna (Engl. Quick and Simple and Reliable, QUASAR) studija uključuje 1.436 pacijenata sa kolorektalnim karcinomom u II stadijumu bolesti. Multivarijantna analiza otkrila je da je deficit MMR-a nezavisna prognostička promenljiva i da je povezan sa boljim preživljavanjem (Kerr DJ et al., 2009).

Fluoropirimidin 5-FU je najčešće korišćen adjuvantni tretman u hemioterapijskom lečenju CRC-a i predstavlja „zlatni standard“ od njegovog uvođenja u kliničku praksu od pre 40. godina. Tamo gde adjuvantna hemioterapija ostaje neobavezna, kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom, kapecitabin ili 5-FU u kombinaciji sa leukovorinom ili kombinacije ovih lekova sa oksaliplatinom smatraju se standardnim mogućnostima lečenja kod pacijenata u III stadijumu bolesti. Kao rezultat ovoga, postoji mnogo suprotstavljenih podataka u vezi sa prediktivnom vrednošću MMR statusa i odgovorom na hemioterapiju na bazi 5-FU.

Neke studije su identifikovale korist od 5-FU (Elsaleh H et al., 2000; Elsaleh H et al., 2001) dok većina studija nije imala nikakvu korist (Des Guetz G et al., 2009; Sargent et al., 2010; Ribic CM

et al., 2003). Pretklinički modeli sugerišu da su dMMR tumori povezani sa rezistencijom na 5-FU (Li LS et al., 2009; Davis TW et al., 1998; Meyers M et al., 2001; Koi M et al., 1994; Arnold CN et al., 2003; Fischer F et al., 2007). Prevladavanje dokaza takođe sugeriše da je adjuvantna hemioterapija zasnovana na 5-FU neefikasna kod pacijenata sa dMMR tumorima (Vilar E and Gruber SB, 2010), iako su neke studije pokazale da pacijenti sa deficitom MMR-a u poređenju sa pMMR tumorima imaju sličnu ili čak veću korist od adjuvantnog tretmana na bazi 5-FU (Elsaleh H et al., 2000; Hemminki A et al., 2000; Westra JL et al., 2005). Sukobljeni rezultati zasnovani su na studijama u kojima pacijenti nisu nasumično raspoređivani u lečenju zasnovanom na 5-FU naspram posmatranja nakon hirurške resekcije, relativno malog broja pacijenata sa dMMR karcinomom debelog creva i bimodalne starosne raspodele među ovim pacijentima. Shodno tome, uticaj dMMR statusa kao prognostičkih i prediktivnih faktora idealno se proučava na kohorti kliničkog ispitivanja pacijenata iste faze koji primaju uniformnu terapiju.

Istraživanje od strane Sargent i saradnika uključuje 457 pacijenata sa kolorektalnim karcinomom u stadijumu II i III koji su bili uključeni u pet nasumičnih ispitivanja koja su ocenjivala 5-FU pomoćnu hemioterapiju u poređenju sa posthirurškim lečenjem (Sargent DJ et al., 2010). U ovoj analizi, pacijenti sa dMMR karcinomom imali su znatno bolje preživljavanje od pacijenata sa pMMR tumorima, iako dMMR tumori bilo koje faze nisu imali koristi od pomoćne hemioterapije zasnovane na 5-FU. Ovi nalazi su potvrđeni kombinovanjem ovih podataka sa onima iz prethodne studije Ribic i saradnici (Ribic CM et al., 2003), dajući ukupno 1.027 pacijenata sa kolorektalnim karcinomom u stadijumu II i III. Treba napomenuti da je sugestija o štetnom dejstvu 5-FU viđena kod pacijenata sa dMMR tumorima u stadijumu II. Ovi podaci ukazuju na to da pacijenti sa dMMR karcinomima u stadijumu II ne bi trebalo da primaju adjuvantnu hemioterapiju zasnovanu na bazi 5-FU.

Nedostatak efikasnosti adjuvantne hemioterapije na bazi 5-FU kod pacijenata sa dMMR kolorektalnim karcinomima u stadijumu II primećen je i u ispitivanju pomoćne terapije (Engl. Quick and Simple and Reliable, QUASAR) gde su pacijenti sa kolorektalnim karcinomom u II stadijumu bolesti primili adjuvantnu hemioterapiju na bazi 5-FU nasuprot pacijentima koji nisu primili hemioterapiju. (Gray R et al., 2007). Prognostički uticaj dMMR-a kod pacijenata sa CRC-om u stadijumu II i III dalje je ispitivan korišćenjem objedinjene analize podataka iz sedamnaest pomoćnih ispitivanja (Sargent DJ et al., 2014). U ovoj analizi učestvovalo je 7.803 pacijenta, od kojih 571 pacijent nije primio adjuvantnu hemioterapiju, a 3.878 pacijenata je primilo adjuvantnu monoterapiju na bazi 5-FU. Među pacijentima u II stadijumu bolesti, dMMR tumori u odnosu na pMMR su bili povezani sa boljim preživljavanjem bez bolesti i boljim ukupnim preživljavanjem kod pacijenata lečenih samo hirurški. Međutim, takva prednost dMMR nad pMMR je umanjena kod pacijenata lečenih adjuvantnom hemioterapijom na bazi 5-FU. Među pacijentima sa kolorektalnim karcinomom u III stadijumu bolesti koji su lečeni samo operativno, takođe je utvrđeno da oni sa dMMR tumorima imaju bolji ishod u odnosu na tumore sa pMMR. U III stadijumu bolesti pacijenata sa CRC-om, primećeno je statistički značajno bolje preživljavanje bez bolesti u grupi

pacijenata koji su primili adjuvantnu monoterapiju 5-FU u odnosu na grupu pacijenata koji su samo hirurški lečeni. Primećena je statistički značajna razlika u grupi pacijenata sa proficijentnim MMR tumorima.

U studiji koja je obuhvatila 2.141 kolorektalnih karcinoma u stadijumu bolesti II i III, pokazalo se da pacijenti sa dMMR karcinomom imaju smanjenu stopu recidiva i bolju opštu stopu preživljavanja u poređenju sa pMMR karcinomima (Sinicrope FA et al., 2011). Preliminarni podaci iz ove studije povećavaju mogućnost da se korisnost MMR statusa kao prediktivnog faktora za lečenje kolorektalnih karcinoma adjuvantnom terapijom pomoću 5-FU može razlikovati u skladu sa molekularnim mehanizmom, koji čeka dalju procenu u budućim istraživanjima.

Uprkos ovim nalazima, neke studije (Meng W et al., 2007; Du, J. Zhao, W. Xue, F. Dou, and J. Gu, 2013; Carethers JM et al., 2004; Lamberti C et al., 2007; Jover R et al., 2006) nisu pronašle povezanost nedostatka MMR-a sa povoljnim ishodom, uključujući i ispitivanje kooperativne grupe (Kim GP et al., 2007), pri čemu nisu pronađene razlike u preživljavanju kod pacijenata sa MMR-deficijentnim karcinomom debelog creva u poređenju sa onima koji su imali MMR-proficijentne tumore.

U drugoj po veličini publikaciji Sargent-a i saradnika (Sargent DJ et al., 2010), koja uključuje ukupno 1027 pacijenata sa CRC-om, nije zabeležena razlika u petogodišnjoj stopi preživljavanja bez bolesti kod pacijenata sa mikrosatelitski nestabilnim odnosno deficitarnim MMR statusom. U studiji koja uključuje 512 lečenih pacijenata sa CRC-om u stadijumu II i III, primećeno je statistički značajno poboljšanje preživljavanja bez bolesti kod pacijenata sa MSS tumorima u stadijumu III koji su primali adjuvantnu hemioterapiju na bazi 5-FU ali nije primećen efekat lečenja kod pacijenata sa MSI tumorima. Takođe, nije nađena statistički značajna korist primenjene adjuvantne hemioterapije kod pacijenata sa MSS tumorima u stadijumu II, dok je trend ka lošijem ishodu primećen kod pacijenata sa MSI tumorima (Tejpar S et al., 2011). Faktori koji mogu objasniti ovu diskrepancu podataka uključuju nedovoljnu veličinu uzorka, jer pacijenti sa MMR-deficijentnim tumorima predstavljaju relativno mali podskup slučajeva i umerenu veličinu MMR prognostičkog efekta.

U našoj studiji, srednji period praćenja bio je približno 2 godine (22.43 ± 6.66 meseci) i za to vreme je letalni ishod registrovan kod 21 pacijenta, dok je relapsa bilo kod 14 pacijenata. Pojava relapsa u našoj populacije bila je češća kod pacijenata sa tumorom visokog histološkog gradusa.

Koristeći univarijantnu Cox-regresionu analizu identifikovali smo moguće prediktore preživljavanja bez bolesti, ali u multivarijantnom modelu nije se pokazalo da je bilo koja od promenljivih značajan nezavisni faktor. Nedostatak MMR-a nije se pokazao kao značajan prediktor preživljavanja bez bolesti. Kolorektalni adenokarcinom sa proficijentnim MMR statusom bio je prediktor dužeg preživljavanja bez bolesti u poređenju sa bilo kojim gubitkom ekspresije MMR-a, posebno

gubitkom nuklearne ekspresije heterodimernog para MLH1/PMS2. Gubitak ekspresije proteina MLH1/PMS2 povezan je sa kraćim preživljavanjem bez bolesti kod pacijenata sa limfovaskularnom invazijom, perineuralnom invazijom, stadijumom III i tumorima visokog histološkog gradusa u poređenju sa MMR proficijentnim tumorima. Letalni ishod je bio povezan sa mucinoznim adenokarcinomom, perineuralnom i limfovaskularnom invazijom, stadijumom III, tumorima visokog histološkog gradusa i prethodnim relapsom. Nije bilo statistički značajne razlike u ukupnom preživljavanju između deficijentnih i proficijentnih MMR tumora. Jedini nezavisni prediktori ukupnog preživljavanja u multivarijantnom modelu su bili starija životna dob pacijenata i visok histološki gradus tumora.

Heterogena imunoreaktivnost tumorskih ćelija je definisana u skladu sa kriterijumima koje su postavili Joost i saradnici (Joost P et al., 2014), kao tumori koji pokazuju intra-glandularnu heterogenost (snažno imunoreaktivne tumorske ćelije pomešane sa negativnim kancerskim ćelijama) i/ili zonalnu heterogenost (zonalni gubitak nuklearne ekspresije tumorskih ćelija koji uključuje više susednih žlezda).

Radi obezbeđivanja pouzdanosti rezultata dobijenih izvedenim imunohistohemijskim procedurama za pojedine slučajeve, procedura imunohistohemijskog obeležavanja izvođena je u nekoliko navrata pod različitim uslovima baziranim na: modifikacijama demaskiranja antigena, dužini ekspozicije antitelima, koncentraciji primarnih antitela i tome slično. Veliki procenat slučajeva pokazuje područja slabog imunohistohemijskog bojenja koja koegzistiraju sa oblastima sa jakim nuklearnim bojenjem kako intra-glandularno tako i zonalno. Nakon analize celokupnog uzorka u pojedinim patohistološkim slučajevima tumorske ćelije na periferiji preparata i prema invazivnom frontu su pokazale snažnu imunoreaktivnost, dok su centralno lokalizovane tumorske ćelije pokazale gubitak ekspresije MMR proteina. Trenutno nema dovoljno podataka koji nude jasne smernice o interpretaciji heterogene ekspresije ovih markera. Malo se pažnje posvetilo takvim heterogenim obrascima bojenja, bez stvarnog molekularnog objašnjenja ovog fenomena ili njegovih mogućih implikacija. Nekoliko istraživača je takve obrasce heterogenog bojenja smatralo artefaktom što nije slučaj u našem istraživanju jer se veliki broj uzoraka imunohistohemijski ponavljao, a na svakom preparatu je postojala unutrašnja kontrola. Okolne stromalne ćelije, zapaljenske ćelije ili neizmenjen epitel kolona su pokazali nuklearnu ekspresiju MMR proteina. S obzirom na insuficijentne podatke o heterogenosti unutar tumora, heterogena IHC ekspresija predstavlja glavni problem u proceni biomarkera za donošenje odluka o lečenju. Analiza heterogene ekspresije ovih markera predstavlja savremeni pristup u istraživanju tumora čiji rezultati bi mogli imati značaj u identifikaciji pacijenata za primenu ciljane personalizovane terapije. Dakle, jedan od ciljeva ove studije je bio i ispitivanje heterogene ekspresije MMR proteina u tumorskim ćelijama kod pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. Kod većine pacijenata sa deficitarnim MMR tumorima, gubitak IHC ekspresije MMR proteina u jedrima tumorskih ćelija ujednačen je u celom tumoru. (Hatch SB et al., 2005). Međutim zabeleženi su slučajevi koji pokazuju heterogeni obrazac bojenja (Watson N et al., 2007). Prema našim

saznanjima, ovo je prvo istraživanje u Srbiji koje ima za cilj da definiše demografske, kliničke i mikromorfološke karakteristike intratumorske heterogene ekspresije MMR proteina u karcinomu debelog creva i rektuma. Na osnovu dobijenih rezultata zalažemo se da se tumore koji pokazuju heterogena područja bojenja (gubitak IHC bojenja MMR proteina pomešano sa područjima jake i difuzne zadržane ekspresije MMR proteina) ne bi trebalo automatski smatrati MMR IHC-netaknutim/zadržanim slučajevima ili arteficialnim. Nakon što se osigura vernost IHC bojenja, ove slučajeve treba dalje istražiti molekularnim analizama, uključujući MSI testiranje analizom lančane polimerazne reakcije i drugim testovima. Klinički značaj identifikovanja heterogenih obrazaca bojenja IHC analizom zahteva dalje proučavanje i dodatne genetske analize, u cilju definisanja novih tumorskih profila i molekularnih mehanizama radi određivanja adekvatnih terapijskih i prognostičkih implikacija.

Imunohistohemijska analiza ekspresije sva četiri MMR proteina u tumorskim tkivima kolorektalnog karcinoma u našoj studiji potvrdila je heterogenu/neujednačenu ekspresiju u 12 tumora. Heterogena/neujednačena ekspresija PMS2 proteina i heterodimernog para MLH1/PMS2 je nadjena u 2 tumora, MSH2/MSH6 u 7 tumora (od kojih su dva takođe izrazila heterogenost i za MLH1/PMS2) i MSH6 samo u 1 tumoru. U 7 od 12 tumora mikromorfološki koegzistiraju oba oblika heterogene ekspresije proteina u tumorskom tkivu, kao intraglandularna i zonalna heterogenost. Izolovana intraglandularna heterogena ekspresija proteina nadjena je kod dva tumora, dok je zonalna heterogenost prisutna u tri tumora. U početku studije heterogena ekspresija MMR proteina je priključena grupi proficijentnih MMR tumora zbog pozitivne nuklearne ekspresije tumorskih ćelija, ali je kasnije izdvojena kao zasebna grupa. U našem istraživanju utvrđen je samo jedan statistički značajan prediktor heterogene ekspresije MMR proteina, u poređenju sa proficijentnom, a to je prisutvo limfovaskularne invazije. Međutim, nije utvrđen ni jedan statistički značajan prediktor heterogenog MMR statusa u poređenju sa deficitarnim. Demografske, kliničke i mikromorfološke karakteristike heterogenog MMR statusa su pacijenti mlađi od 50. godina i desnostrana lokalizacija tumora. Natasha i saradnici su otkrili oko 10% heterogene ekspresije MMR proteina kod mlađih pacijenata sa kolorektalnim karcinomom. U početku studije su ove slučajeve priključili grupi proficijentnih tumora, ali su kasnije izdvojeni, jer se pokazalo da najmanje tri od sedam (42%) slučajeva sadrže germinativne mutacije (Natasha W et al., 2007). Ovakva zapažanja potvrđuje i nekoliko predhodnih studija (Mangold E et al., 2005; Shia J et al., 2005).

Postoji nekoliko limitacija u ovoj studiji koje uključuju prikupljene podatke iz jednog centra u periodu od dve godine. Takođe nije izvršena PCR analiza, hipermetilacija MLH1 gena i BRAF testiranje kako bismo potvrdili pacijente sa Linč sindromom zbog ograničenih resursa.

Na osnovu rezultata dobijenih iz ove studije mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Deficit imunohistohemijske ekspresije barem jednog proteina iz grupe MMR-a je prisutan u tumorskom tkivu resekovanih kolorektalnih karcinoma u stadijumu II i III kod 11.54% ispitanika, dok je proficijentna ekspresija MMR-a bila prisutna kod 92 ispitanika.
2. Najučestaliji gubitak ekspresije MMR proteina u jedrima tumorskih ćelija ispitivanih kolorektalnih karcinoma u celokupnom uzorku je deficit ekspresije heterodimernih parova MLH1/PMS2 proteina, što je registrovano kod 6.73% ispitanika.
3. Multivarijantna regresiona analiza uzimajući u razmatranje različite demografske, kliničke i mikromorfološke karakteristike kolorektalnih karcinoma (životna dob, pol, anatomska lokalizacija tumora, primenjena hemioterapija na bazi 5-FU, stadijum bolesti II i III, histološki tip tumora, histološki gradus tumora, sekrecija mucina, peritumorska limfocitna infiltracija, „Crohn-like“ reakcija, tumorsko pupljenje, limfovaskularna i perineuralna invazija tumorskih ćelija) je statistički značajno povezala deficit MMR proteina sa desnostranom lokalizacijom karcinoma kolona i mlađom životnom dobi pacijenata. Dakle, ova studija osvetljava učestalost deficitarnih MMR tumora kod pacijenata mlađe životne dobi i kod desnostrane lokalizacije karcinoma.
4. Heterogena/neujednačena ekspresija MMR proteina u tumorskoj masi barem jednog MMR proteina je registrovana u 12 ispitanika sa kolorektalnim karcinomom, među njima najčešći mikromorfološki obrazac histološke distribucije heterogene imunohistohemijske ekspresije je kombinacija zonalne intratumorske i heterogene/neujednačene intraglandularne ekspresije u pojedinačnim kancerskim žlezdama prisutna kod 7 ispitanika. Izolovana zonalna ekspresija proteina je evidentirana kod tri ispitanika, a intraglandularna kod dva.

5. Multivarijantna regresiona analiza uzimajući u obzir različite demografske, kliničke i mikromorfološke parametre (životna dob, pol, anatomska lokalizacija tumora, primljena hemioterapija na bazi 5-FU, stadijum bolesti II i III, histološki tip tumora, histološki gradus tumora, sekrecija mucina, peritumorska limfocitna infiltracija, „Crohn-like“ reakcija, tumorsko pupljenje, limfovaskularna i perineuralna invazija tumorskih ćelija) je statistički značajno povezala heterogenu imunohistohemijsku ekspresiju MMR proteina sa životnom dobi manjom od 50. godina i desnostranom lokalizacijom tumora. Obzirom na ovu statistički značajnu povezanost heterogene ekspresije MMR proteina sa životnom dobi manjom od 50. godina i desnostranom lokalizacijom tumora, ove slučajeve treba dalje istražiti različitim molekularnim analizama, uključujući MSI testiranje PCR metodom i drugim testovima zbog mogućnosti postojanja deficitarnog MMR statusa.
6. Metodom univarijantne binarne logističke regresije utvrđen je samo jedan statistički značajan prediktor heterogene ekspresije MMR statusa u poređenju sa proficijentnim, prisutvo limfovaskularne invazije.
7. Pokazalo se da imunohistohemijska nuklearna ekspresija MMR proteina (deficijentna i proficijentna) kod ispitanika sa kolorektalnim karcinomom u stadijumu bolesti II i III nije značajan prediktor preživljavanja bez recidiva i ukupnog preživljavanja. Deficijentni MMR status je obećavajući faktor koji bi potencijalno mogao da omogući predviđanje reakcije pacijenata sa CRC-om koji su primili adjuvantnu hemioterapiju na bazi 5-FU u stadijumu II i III. Međutim, uloga deficitarnog MMR statusa kao prediktivnog markera i dalje ostaje kontroverzna.
8. Proficijentna ekspresija MMR proteina je kod karcinoma bez sekrecije mucina bila prediktor dužeg preživljavanja bez recidiva u poređenju sa bilo kojim gubitkom ekspresije MMR proteina, naročito sa gubitkom ekspresije heterodimernog para MLH1/PMS2.
9. Gubitak ekspresije MLH1/PMS2 proteina u jedrima ispitivanih kolorektalnih karcinoma, u poređenju sa proficijentnom ekspresijom sva četiri MMR proteina, povezan je sa kraćim preživljavanjem bez recidiva kod pacijenata sa izraženom peritumorskom limfocitnom infiltracijom, limfovaskularnom i perineuralnom invazijom, III stadijumom bolesti, visokim histološkim gradusom tumora i pozitivnom „Crohn-like“ reakcijom.
10. Iako su univarijantnom Cox-regresijskom analizom identifikovani brojni mogući prediktori ukupnog preživljavanja u ispitivanoj grupi, jedini nezavisni prediktori u multivarijantnom modelu bili su starija životna dob i visok histološki gradus tumora.

11. Imunohistohemijska analiza predstavlja jednostavnu, brzu, lako izvodljivu, pouzdanu i jeftinu metodu određivanja deficitarnog MMR statusa u hirurški resekovanom materijalu kolorektalnog karcinoma i treba je u nekim slučajevima ponavljati radi obezbeđivanja pouzdanosti rezultata.

Aaltonen L, Peltomäki P, Leach F, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin J, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260(5109):812–6.

Al-Maghrabi J, Gomaa W, Buhmeida A, Al-Qahtani M, Al-Ahwal M. Loss of villin immunoexpression in colorectal carcinoma is associated with poor differentiation and survival. *ISRN Gastroenterol.* 2013;2013:679724.

Alvi M.A., Loughrey M.B., Dunne P., McQuaid S., Turkington R., Fuchs M.A., McGready C., Bingham V., Pang B., Moore W., et al. Molecular profiling of signet ring cell colorectal cancer provides a strong rationale for genomic targeted and immune checkpoint inhibitor therapies. *Br. J. Cancer.* 2017;117:203–209.

Andrews MC, Wargo JA. Immunotherapy resistance: the answers lie ahead - not in front - of us. *J Immunother Cancer.* 2017;5:10.

Arango D, Al-Obaidi S, Williams DS, et al. Villin expression is frequently lost in poorly differentiated colon cancer. *Am J Pathol.* 2012;180(4):1509–1521.

Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res.* 2012; 5(1):19-27.

Arnold CN, Goel A, Boland CR. Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer* 2003;106:66-73.

Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* 2017;66(4):683-691.

Astler VB, Collier FA: The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954; 139:846.

Aykan NF. Red meat and colorectal cancer. *Oncol Rev*. 2015;9(1):38-44.

Baglietto L, Lindor NM, Dowty JG, et al. Risks of Lynch syndrome cancers for MSH6 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. 2010; 102(3):193-201.

Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*.1990; 249:912– 915.

Battaglin F, Naseem M, Lenz H, Salem M. Microsatellite instability in colorectal cancer: overview of its clinical significance and novel perspectives. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2018;16(11):735–45.

Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*. 2001;91(4):854-862.

Betge J, Pollheimer MJ, Lindtner RA, et al. Intramural and extramural vascular invasion in colorectal cancer: prognostic significance and quality of pathology reporting. *Cancer*. 2012;118:628–38.

Boland C, Thibodeau S, Hamilton S, Sidransky D, Eshleman J, Burt R, Meltzer S, Rodriguez-Bigas M, Fodde R, Ranzani G, Srivastava S. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58, 5248-5257.

Boland CR, Shike M. Report from the Jerusalem workshop on Lynch syndrome-hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138:2197.

Branca G., Ieni A., Barresi V., Tuccari G., Caruso R.A. An updated review of cribriform carcinomas with emphasis on histopathological diagnosis and prognostic significance. *Oncol. Rev*. 2017;11:317.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394–424.

Bu X-D, Li N, Tian X-Q, et al. Altered expression of MUC2 and MUC5AC in progression of colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2010;16:4089–4094.

Bujanda L, Cosme A, Gil I, Arenas-Mirave JI. Malignant colorectal polyps. *World J Gastroenterol*. 2010 Jul 07;16(25):3103-11.

Butterworth AS, Higgins JP, Pharoah P. Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. Jan 2006;42(2):216-227. 27.

Buza N, Ziai J, Hui P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(5):591–604.

Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2004;23:77–99.

Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006; 23(8):1097-104.

Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, Nguyen L, Tajima A, Doctolero RT, et al. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology* 2004; 126 : 394-401.

Chae HD, Jeon CH. Peutz-Jeghers syndrome with germline mutation of STK11. *Ann Surg Treat Res*. 2014;86:325–30.

Chen W, BJ S, Frankel W. Molecular genetics of microsatellite-unstable colorectal cancer for pathologists. *Diagn Pathol*. 2017;4(12):24.

Chew, M.H.; Koh, P.K.; Tan, M.; Lim, K.H.; Carol, L.; Tang, C.L. Mismatch repair deficiency screening via immunohistochemical staining in young Asians with colorectal cancers. *World J Surg*. 2013, 37, 2468–2475.

Chirieac LR, Shen L, Catalano PJ, Issa JP, Hamilton SR. Phenotype of microsatellitestable colorectal carcinomas with CpG island methylation. *Am J Surg Pathol*. 2005 ;29(4):429–36.

Chow E, Lipton L, Lynch E, et al. Hyperplastic polyposis syndrome: Phenotypic presentations and the role of MBD4 and MYH. *Gastroenterology*. 2006;131:30–39.

Chung D, Rustgi A. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med*. 2003;138(7):560-70.

Cicek MS, Lindor NM, Gallinger S, Bapat B, Hopper JL, Jenkins MA, Young J, Buchanan D, Walsh MD, Le Marchand L, et al. Quality assessment and correlation of microsatellite instability and immunohistochemical markers among population- and clinic-based colorectal tumors results from the Colon Cancer Family Registry. *J Mol Diagn*. 2011;13:271–281.

Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 ;124(7):979-94.

Costas-Chavarri A, Nandakumar G, Temin S, et al. Treatment of patients with early-stage colorectal cancer: ASCO resource-stratified guideline. *J Glob Oncol*. 2019;5:1–19.

Cysik AL, Nugent Z, Wightman RH, Singh H, McManus KJ. Characterizing Microsatellite Instability and Chromosome Instability in Interval Colorectal Cancers. *Neoplasia*. 2018;20(9):943–50.

Davis TW, Wilson-Van Patten C, Meyers M, et al. Defective expression of the DNA mismatch repair protein, MLH1, alters G2-M cell cycle checkpoint arrest following ionizing radiation. *Cancer Res* 1998;58:767-78.

Dawson H, Koelzer VH, Lukesch AC, Mallaev M, Inderbitzin D, Lugli A, et al. Loss of Cdx2 expression in primary tumors and lymph node metastases is specific for mismatch repair-deficiency in colorectal cancer. *Front Oncol*. 2013;3:265.

De Jong A, Morreau H, Van Puijnenbroek M, Eilers P, Wijnen J, Nagengast F, et al. The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. *Gastroenterology*. 2004;126(1):42–8.

de La Chapelle A. Microsatellite instability phenotype of tumors: genotyping or immunohistochemistry? The jury is still out. *J Clin Oncol*. 2002;20:897–899.

Des Guetz G, Schischmanoff O, Nicolas P, Perret GY, Morere JF, Uzzan B. Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2009;45:1890–1896.

Du, J. Zhao, W. Xue, F. Dou, and J. Gu, “Prognostic value of microsatellite instability in sporadic locally advanced rectal cancer following neoadjuvant radiotherapy,” *Histopathology* 2013; 62(5): 723–730.

- Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem.* 2001; 47(4):624-30.
- Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *Journal of Pathological Bacteriology* 1932; 35:323.
- Durko L, Malecka-Panas E. Lifestyle modifications and colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2014;10(1):45-54.
- Duval A, Rolland S, Compoint A, Tubacher E, Iacopetta B, Thomas G, Hamelin R. Evolution of instability at coding and non-coding repeat sequences in human MSI-H colorectal cancers. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(5):513-8.
- Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut.* Apr 2001;48(4):526-535.
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *AJCC cancer staging manual (7th ed).* New York, NY: Springer; 2010.
- Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet.* 2000;355:1745–1750.
- Elsaleh H, Powell B, Soontrapornchai P, Joseph D, Gorla F, Spry N, et al. p53 gene mutation, microsatellite instability and adjuvant chemotherapy: impact on survival of 388 patients with Dukes' C colon carcinoma. *Oncology.* 2000;58(1):52–9.
- Elsaleh H, Shannon B, Iacopetta B. Microsatellite instability as a molecular marker for very good survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *Gastroenterology.* 2001;120:1309–1310.
- Evans C, Dalglish AG, Kumar D: Review article: immune suppression and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006; 24: 1163-1177.
- Fagan JJ, Collins B, Barnes L, D'Amico F, Myers EN, Johnston JT. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998 Jun;124(6):637-40 121.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990; 61(5):759-67.

Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin D, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941-1953.

Fischer F, Baerenfaller K, Jiricny J. 5-Fluorouracil is efficiently removed from DNA by the base excision and mismatch repair systems. *Gastroenterology* 2007;133:1858-68.

Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, et al., editors. *AJCC manual for staging of cancer*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven; 1997.

Fujiyoshi K, Yamamoto G, Takenoya T, Takahashi A, Arai Y, Yamada M, et al. Metastases Pattern of Stage IV Colorectal Cancer with High-Frequency Microsatellite Instability as a Prognostic Factor. *Anticancer Res*. 2017;31(1):239-247.

Fureder T, Agis H, Kornek G, Scheithauer. *Kolorektalkarzinom*. *Wien Klin Wochenschr Educ* 2012 ;7:77–91.

Gabbert H, Wagner R, Moll R, Gerharz CD. Tumor dedifferentiation: an important step in tumor invasion. *Clin Exp Metastasis*. 1985;3(4):257-79.

Gafà R, et al. Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer*. 2000;89:2025–2037.

Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960–1964.

Galon J, Mlecnik B, Bindea G et al. Towards the introduction of the ‘Immunoscore’ in the classification of malignant tumours. *J Pathol*. 2014 ;232(2):199-209.

García-Solano J, Pérez-Guillermo M., Conesa-Zamora P, Acosta-Ortega J, Trujillo-Santos J, Cerezuela-Fuentes P, Mäkinen M.J. Clinicopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas: Further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma. *Hum. Pathol*. 2010;41:1359–1368.

García-Solano J., Conesa-Zamora P., Trujillo-Santos J., Mäkinen M.J., Pérez-Guillermo M. Tumour budding and other prognostic pathological features at invasive margins in serrated colorectal adenocarcinoma: A comparative study with conventional carcinoma. *Histopathology*. 2011;59:1046–1056.

Gazzoli I, Loda M, Garber J, Syngal S, Kolodner RD. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res.* 2002;62:3925–3928.

Geary J, Sasieni P, Houlston R, et al. Gene-related cancer spectrum in families with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Fam Cancer.* 2008; 7(2):16372.

Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A, Pugliese G, Cascinu S. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: a review. *Cancer Treat Rev.* 2016;51:19–26.

Ghanipour L, Jirström K, Sundström M, Glimelius B, Birgisson H. Associations of defect mismatch repair genes with prognosis and heredity in sporadic colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2017;43(2):311–21.

Gibson J, Lacy J, Matloff E, Robert M. Microsatellite instability testing in colorectal carcinoma: a practical guide. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014;12(2):171–6.

Giovannucci E, Chan AT. Role of vitamin and mineral supplementation and aspirin use in cancer survivors. *J Clin Oncol.* 2010;28(26):4081-4085.

Gologan A, Sepulveda AR. Microsatellite instability and DNA mismatch repair deficiency testing in hereditary and sporadic gastrointestinal cancers. *Clin Lab Med.* 2005;25(1):179-96.

Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res.* 2011;71(1):245-54.

Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2008;135:1079–99.

Green J.B., Timmcke A.E., Mitchell W.T., Hicks T.C., Gathright J.B.J., Ray J.E. Mucinous carcinoma—Just another colon cancer? *Dis. Colon Rectum.* 1993;36:49–54.

Greene FL, Balch CM, Fleming ID, et al., editors. *AJCC manual for staging of cancer.* 6th ed. New York: Springer Verlag; 2002.

Guastadisegni, C.; Colafranceschi, M.; Ottini, L.; Dogliotti, E. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: A meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur. J. Cancer* 2010, 46, 2788–2798.

Guzinska-Ustymowicz K. The role of tumour budding at the front of invasion and recurrence of rectal carcinoma. *Anticancer Res.* 2005 ;25(2B):1269-72.

Guzińska-Ustymowicz K., Niewiarowska K., Pryczynicz A. Invasive micropapillary carcinoma: A distinct type of adenocarcinomas in the gastrointestinal tract. *World J. Gastroenterol.* 2014;20:4597–4606.

Halling KC, et al. Microsatellite instability and 8p allelic imbalance in stage B2 and C colorectal cancers. *J. Natl Cancer Inst.* 1999;91:1295–1303.

Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, eds. Lyon: IARC Press, 2010:134-46.

Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med.* 1995; 332(13):839-47.

Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26:5783–5788.

Harbaum L, Pollheimer MJ, Kornprat P, et al. Keratin 20 - a diagnostic and prognostic marker in colorectal cancer?. *Histol Histopathol.* 2012;27(3):347–356.

Harrison JC, Dean PJ, el-Zeky F, Vander Zwaag R. Impact of the Crohn's-like lymphoid reaction on staging of right-sided colon cancer: results of multivariate analysis. *Hum Pathol.* 1995;26(1):31-8.

Hashmi, A.A.; Ali, R.; Hussain, Z.F.; Faridi, N.; Khan, E.Y.; Bakar, S.M.A.; Edhi, M.M.; Khan, M. Mismatch repair deficiency screening in colorectal carcinoma by a four-antibody immunohistochemical panel in Pakistani population and its correlation with histopathological parameters. *World J. Surg. Oncol.* 2017, 15, 116.

Hatch SB, Lightfoot HM Jr, Garwacki CP, Moore DT, Calvo BF, Woosley JT, Sciarrotta J, Funckhouser WK, Farber RA. Microsatellite instability testing in colorectal carcinoma: choice of markers affects sensitivity of detection of mismatch repair-deficient tumors. *Clin Cancer Res.* 2005;11(6):2180-7.

Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature.* 1998; 391(6663):184-7.

Hemminki A, Mecklin JP, Jarvinen H, et al. Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology* 2000;119:921-8.

Hohenberger W, Weber K, Matzel K, Papadopoulos T, Merkel S. Standardized surgery for colonic cancer: Complete mesocolic excision and central ligation - Technical notes and outcome. *Colorectal Disease*. 2009;11(4):354-64.

Hugen N., van de Velde C.J., de Wilt J.H., Nagtegaal I.D. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Ann. Oncol.* 2014;25:651–657.

Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int J Cancer*. Jul 1 2009;125(1):171-180.

Jakubowska K., Guzińska-Ustymowicz K., Pryczynicz A. Invasive micropapillary component and its clinico-histopathological significance in patients with colorectal cancer. *Oncol. Lett.* 2016;12:1154–1158.

Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. Jun 2010;138(6):2044-2058.

Jass JR, Ajioka Y, Allen JP, Chan YF, Cohen RJ, Nixon JM, et al. Assessment of invasive growth pattern and lymphocytic infiltration in colorectal cancer. *Histopathology*. 1996;28(6):543–8.

Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007;50:113–30.

Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, Loff S, Jeschke R, et al. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet.* 1998; 18(1):38-43.

Jing Y, Han Z, Zhang S, Liu Y, Wei L. Epithelial-Mesenchymal Transition in tumor microenvironment. *Cell Biosci* 2011; 1:29.

Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:335–46.

Joost P, Veurink N, Holck S, Klarskov L, Bojesen A, Harbo M, Baldetorp B, Rambech E, Nilbert M. Heterogenous mismatch-repair status in colorectal cancer. *Diagn Pathol.* 2014;9:126.

Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, et al. Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. *Eur J Cancer*. 2009;45(3):365–73.

Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, et al. Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer. *Gut* 2006; 55 : 848-55.

Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol*. Oct 2001;96(10):2992- 3003.

Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* 2009 ;119(6):1417–9.

Kawakami H., Zaanani A., Sinicrope F.A. Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. *Curr. Treat. Opt. Oncol*. 2015;16:30. doi: 10.1007/s11864-015-0348-2.

Kerr DJ, et al. A quantitative multigene RT-PCR assay for prediction of recurrence in stage II colon cancer: selection of the genes in four large studies and results of the independent, prospectively designed QUASAR validation study. *J. Clin. Oncol*. 2009;27(Suppl. 15S):a4000.

Kerr DJ, Midgley R. Defective mismatch repair in colon cancer: a prognostic or predictive biomarker? *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3210–3212.

Kiessling P, Dowling E, Huang Y, Ho ML, Balakrishnan K, Weigel BJ, Highsmith WE, Niu Z, Schimmenti LA. Identification of aggressive Gardner syndrome phenotype associated with a de novo APC variant, c.4666dup. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. 2019 ;5(2).

Kim GP, Colangelo LH, Wieand HS, et al. Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J. Clin. Oncol*. 2007;25:767–772.

Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton S. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol*. 1994;145(1):148-56.

Kim SE. The benefit-risk consideration in long-term use of alternate-day, low dose aspirin: focus on colorectal cancer prevention. *Ann Gastroenterol.* 2014;27(1):878.

Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996;87:159–170.

Kirilovsky A, Marliot F, El Sissy C, Haicheur N, Galon J, Pages F. Rational bases for the use of the Immunoscore in routine clinical settings as a prognostic and predictive biomarker in cancer patients. *Int Immunol.* 2016;28:373–82.

Kirkegaard H, Johnsen NF, Christensen J, Frederiksen K, Overvad K, Tjonneland A. Association of adherence to lifestyle recommendations and risk of colorectal cancer: a prospective Danish cohort study. *BMJ.* 2010;341:c5504.

Koi M, Umar A, Chauhan DP, et al. Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. *Cancer Res* 1994;54:4308-12.

Kuroda N., Oonishi K., Ohara M., Hirouchi T., Mizuno K., Hayashi Y., Lee G.H. Invasive micropapillary carcinoma of the colon: An immunohistochemical study. *Med. Mol. Morphol.* 2007;40:226–230.

Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, et al. on behalf of the ESMO Guidelines Working Group. Early colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2013;24(6):64–72.

Lamberti C, Lundin S, Bogdanow M, Pagenstecher C, Friedrichs N, Buttner R, et al. Microsatellite instability did not predict individual survival of unselected patients with colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2007; 22:145-52.

Landau MS, Kuan SF, Chiosea S, Pai RK. BRAF-mutated microsatellite stable colorectal carcinoma: an aggressive adenocarcinoma with reduced CDX2 and increased cytokeratin 7 immunohistochemical expression. *Hum Pathol.* 2014;45(8):1704–1712.

Landau MS, Sahoo D, Paik S, Guo X, Yothers G, Song N, et al. CDX2 as a prognostic biomarker in stage II and stage III colon cancer. *N Engl J Med.* 2016;374(3):211–222.

Lanza G, et al. Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 2006;24:2359–2367.

Lanza G., Gafà R., Matteuzzi M., Santini A. Medullary-type poorly differentiated adenocarcinoma of the large bowel: A distinct clinicopathologic entity characterized by microsatellite instability and improved survival. *J. Clin. Oncol.* 1999;17:2429–2438.

Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* Nov 16 2005;97(22):1679- 1687.

Larsson SC, Wolk A. Obesity and colon and rectal cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Clin Nutr.* Sep 2007;86(3):556- 565.

Laufman H, Saphir O. Primary linitis plastic type carcinoma of the colon. *AMA Arch. Surg.* 1951;62:79–91.

Lavoie H, Therrien M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(5):281–298.

Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science.* 2017;357:409–13.

Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2509–2520.

Lee L.H., Yantiss R.K., Sadot E., Ren B., Calvacanti M.S., Hechtman J.F., Ivelja S., Huynh B., Xue Y., Shitilbans T., et al. Diagnosing colorectal medullary carcinoma: Interobserver variability and clinicopathological implications. *Hum. Pathol.* 2017;62:74–82.

Lengauer C, Kinzler K, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396:643–649.

Levin B, Lieberman DA, McFarland B, et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous Polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin.* 2008;58(3):130-160.

Li LS, Morales JC, Veigl M, et al. DNA mismatch repair (MMR)-dependent 5-fluorouracil cytotoxicity and the potential for new therapeutic targets. *Br J Pharmacol* 2009;158:679.

Liang JT, Huang KC, Cheng AL, Jeng YM, Wu MS, Wang SM. Clinicopathological and molecular biological features of colorectal cancer in patients less than 40 years of age. *Br J Surg.* 2003; 90(2): 205–14.

Liebig C, Ayala G, Wilks J, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5131–7.

Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, Lee TY, Bodmer D, Hoenselaar E, Hendriks-Cornelissen SJ, et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet.* 2009;41:112–117.

Lin S, Gregory R.I. Micro RNA biogenesis pathways in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2015;15:321–333.

Lindor N, Burgart L, Leontovich O, Goldberg R, Cunningham J, Sargent D, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol.* 2002;15(20):1043–8.

Lindor NM. Familial Colorectal Cancer Type X: the other half of Hereditary Non-Polyposis Colon Cancer Syndrome. *Surg Oncol Clin N Am.* 2009;18(4):637-45.

Linnebacher M, Gebert J, Rudy W, Woerner S, Yuan Y, Bork P, et al. Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int J Cancer.* 2001; 93: 6-11.

Lino-Silva L.S., Salcedo-Hernández R.A., Herrera-Gómez A., Padilla-Rosciano A., Ramírez-Jaramillo M., Herrera-Goepfert R.E., Meneses-García A. Colonic cribriform carcinoma, a morphologic pattern associated with low survival. *Int. J. Surg. Pathol.* 2015;23:13–19.

Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, Papadopolous N, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet.* 1995 Jan;9(1):48-55.

Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol* 2017; 30: 1299–311.142.

Lutgens MW, van Oijen MG, van der Heijden GJ, Vleggaar FP, Siersema PD, Oldenburg B. Declining risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: an updated meta-analysis of population-based cohort studies. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19: 789-799.

Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2003;348:919–32.

Lynch HT, Lynch JF. Lynch syndrome: history and current status. *Dis Markers* 2004; 20(4-5):181-98.

Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet.* 2009;76:1–18.

Lynch HT, Shaw TG. Practical genetics of colorectal cancer. *Chin Clin Oncol.* 2013;2:12.

Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat Rev Cancer.* 2015 ;15(3):181-94.

Mangold E, Pagenstecher C, Friedl W, et al. Tumors from MSH2 expression but many tumors weak positive MLH1 staining. *J Pathol.* 2005; 207:385-395.

Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science.* 1995; 268(5215):1336-8.

Mayer R. Lower Gastrointestinal Cancers. In: Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson L, Loscalzo J, editors. *Harrison's principles of internal medicine*, 30th edition. New York, Chicago, San Francisco, Athens, London: Mc Graw Hill Education; 2016. p. 537-44.

McCarthy RL, Thomas CL, Isaacs F. Multiple benign adnexal tumours: Anything but benign. *Australas. J. Dermatol.* 2019 ;60(3):234-236.

McCullough ML, Robertson AS, Chao A, Jacobs EJ, Stampfer MJ, Jacobs DR, et al. A prospective study of whole grains, fruits, vegetables and colon cancer risk. *Cancer Causes Control* 2003;14(10):959–970.

Meng W, -J, Sun X, -F, Tian C, Wang L, Yu Y, -Y, Zhou B, Gu J, Xia Q, -J, Li Y, Wang R, Zheng X, -L, Zhou Z, -G: Microsatellite Instability Did Not Predict Individual Survival in Sporadic Stage II and III Rectal Cancer Patients. *Oncology* 2007;72:82-88.

Mercader P. Muir-Torre syndrome. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 685:186-95.

Meyers M, Wagner MW, Hwang HS, et al. Role of the hMLH1 DNA mismatch repair protein in fluoropyrimidine-mediated cell death and cell cycle responses. *Cancer Res* 2001;61:5193-201

Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol* 2012; 25: 1315–25.

Miyaki M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, et al. Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res.* 1994;54:3011–3020.

Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, et al. Integrative analyses of colorectal cancer show immunoscore is a stronger predictor of patient survival than microsatellite instability. *Immunity.* 2016;44:698–711.

Moorehead RJ, Campbell GR, Donaldson JD, McKelvey ST. Relationship between duodenal bile acids and colorectal neoplasia. *Gut* 1987;28(11):1454-1459.

Natacha W, Fabienne G, Melinda M, et al. Heterogenous staining for mismatch repair proteins during population-based prescreening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Mol Diagn.* 2007; 9:472-478.

Nagtegaal ID, van der Worp E, van de Velde CJ, et al. Macroscopic evaluation of rectal cancer resection specimens: clinical significance of the pathologist in quality control. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1729–1734.

Newcomb PA, Savu A, Phipps AI, Coghill AE, Yasui Y. Impact of colon cancer screening on family history phenotype. *Epidemiology.* 2012; 23(2):308-10.

Nitsche U., Zimmermann A., Späth C., Müller T., Maak M., Schuster T., Slotta-Huspenina J., Käser S.A., Michalski C.W., Janssen K.P., et al. Mucinous and signet-ring cell colorectal cancers differ from classical adenocarcinomas in tumor biology and prognosis. *Ann. Surg.* 2013;258:775–782.

Nojadeh JN, Sharif SB, Sakhinia E. Microsatellite Instability in Colo-rectal Cancer. *EXCLI J.* 2018;17:159–68.

Nosho K, Baba Y, Tanaka N, et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol.* 2010;222(4):350–366.

Ogino S, Nosho K, Irahara N, et al. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res.* 2009;15(20):6412–6420.

Okuyama T, Nakamura T, Yamaguchi M. Budding is useful to select high-risk patients in stage II well-differentiated or moderately differentiated colon adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum*. 2003 Oct;46(10):1400-6. 139.

Otori K, Konishi M, Sugiyama K, et al. Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue. *Cancer*. 1998;83:896–900.

Overbeek LI, Ligtenberg MJ, Willems RW, et al. Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. *Am J Surg Pathol*. 2008;32:1246–1251.

Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet*. 2012;49:151–7.

Pearlman, R.; Frankel, W.L.; Swanson, B.; Zhao, W.; Yilmaz, A.; Miller, K.; Bacher, J.; Bigley, C.; Nelsen, L.; Goodfellow, P.J.; et al. Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients with Early-Onset Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*. 2017, 3, 464–471.

Peltomaki P. Lynch syndrome genes. *Fam Cancer*. 2005;4(3):227-32.

Pezzi A., Roncucci L., Benatti P., et al. Relative role of APC and MUTYH mutations in the pathogenesis of familial adenomatous polyposis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2009;44(9):1092–1100.

Pi S, Nap-Hill E, Telford J, Enns R. Recognition of Lynch Syndrome Amongst Newly Diagnosed Colorectal Cancers at St. Paul's Hospital. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2017;2017:9625638.

Pinto RS, Simons A, Verma R, Bateman N. Gardener-associated fibroma: an unusual cause of upper airway obstruction. *BMJ Case Rep*. 2018;28;2018.

Ponz de Leon M, Di Gregorio C. Pathology of colorectal cancer. *Dig Liver Dis*. 2001;33(4):372–88.

Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J. Clin. Oncol*. 2005;23:609–618.

Poulsen M. L., Bisgaard M. L. MUTYH associated polyposis (MAP) *Current Genomics*. 2009;9(6):420–435.

Powell S, Zilz N, Beazer-Barclay Y, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*. 1992;359:235–237.

Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology*. 2007;50(1):151-62.

Provenzale D, Gupta S, Ahnen DJ, et al. NCCN guidelines insights: colorectal cancer screening, version 1.2018. *J Natl Compr Canc Netw*. 2018;16:939–49.

Purdie CA, O’Grady J, Piris J, Wyllie AH, Bird CC. p53 expression in colorectal tumors. *Am J Pathol*. 1991; 138: 807–813.

Pyo J.S., Sohn J.H., Kang G. Medullary carcinoma in the colorectum: A systematic review and meta-analysis. *Hum. Pathol*. 2016;53:91–96.

Quasar Collaborative Group¹, Gray R, Barnwell J, et al. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet* 2007;370:2020-9.

Raut C, Pawlik T, Rodriguez-Bigas M. (2004). Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res* 558, 275-282.

Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247-57.

Rizzo A, Pallone F, Monteleone G, Fantini MC. Intestinal inflammation and colorectal cancer: a double-edged sword? *World J Gastroenterol*. 2011; 17(26):3092- 100.

Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89: 1758-62.

Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, et al. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol*. 1997;182(3):318–324.

Rowan A, Halford S, Gaasenbeek M, et al. Refining molecular analysis in the pathways of colorectal carcinogenesis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:1115–1123.

Roxburgh CS, McMillan DC, Anderson JH, McKee RF, Horgan PG, Foulis AG. Elastica staining for venous invasion results in superior prediction of cancer specific survival in colorectal cancer. *Ann Surg.* 2010 ;252(6):989–97.

Roxburgh CS, McMillan DC. The role of the in situ local inflammatory response in predicting recurrence and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Cancer Treat Rev.* 2012;38:451–66.

Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev.* 2007;21(20):2525–38.

Salgado R, Denkert C, Demaria S et al; International TILs Working Group 2014. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015 ;26(2):259-71.

Samad AK, Taylor RS, Marshall T, Chapman MA. A meta-analysis of the association of physical activity with reduced risk of colorectal cancer. *Colorectal Dis.* May 2005;7(3):204-213.

Samowitz WS, et al. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2001;10:917–923.

Samuels Y, Velculescu VE. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle.* 2004;3:1221–1224.

Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, et al. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist.* 2008;13:1270–1275.

Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, French AJ, Kabat B, Foster NR, Torri V, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:3219–3226.

Sargent DJ, Shi Q, Yothers G, et al. Prognostic impact of deficient mismatch repair (dMMR) in 7,803 stage II/III colon cancer (CC) patients (pts): A pooled individual pt data analysis of 17 adjuvant trials in the ACCENT database. *J Clin Oncol* 2014;32:5s

Scarpa M, Ruffolo C, Canal F, Scarpa M, Basato S, Erroi F et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancer enhance immune surveillance. *Oncotarget.* 2015;6(41):43472–82.

Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology*. 2008; 135(2):41928.

Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, et al. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: guideline from the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2017;35:1453–86.

Shepherd N, Baxter K, Love S . The prognostic importance of peritoneal involvement in colonic cancer: a prospective evaluation. *Gastroenterology* 1997; 112: 1096–1102.

Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn*. 2008;10:293–300.

Shia J, Klimstra DS, Nafa K, et al. Value of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair proteins in predicting germ-line mutation in hereditary colorectal neoplasmas. *Am J Surg Pathol*. 2005; 29:96-104.

Sinicrope F.A., Okamoto K., Kasi P.M., Kawakami H. Molecular biomarkers in the personalized treatment of colorectal cancer. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 2016;14:651–658. doi: 10.1016/j.cgh.2016.02.008.

Sinicrope FA, et al. Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology*. 2006;131:729–737.

Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, et al. DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:863-75.

Siu IM, Pretlow TG, Amini SB, Pretlow TP. Identification of dysplasia in human colonic aberrant crypt foci. *Am J Pathol*. 1997;150:1805–1813.

Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, et al. Colorectal cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2017;67:177-93.

Smyrk TC, Watson P, Kaul K, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer*. 2001;91(12):2417–2422.

Snover DC, Ahnen DJ, Burt RW, Odze RD. Serrated polyps of the colon and rectum and serrated polyposis. In: Bosman ST, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editors. WHO Classification of tumours of the digestive system. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2010. pp. 160–65.

Sounni NE, Noel A. Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy. *Clin Chem*. 2013;59(1):85-93.

Stacchi L, Nelson H, Sargent DJ, et al. Impact of surgical and pathological variables in rectal cancer: a United States community and cooperative group report. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3895–3902.

Stefanius K., Ylitalo L., Tuomisto A., Kuivila R., Kantola T., Sirniö P., Karttunen T.J., Mäkinen M.J. Frequent mutations of KRAS in addition to BRAF in colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology*. 2011;58:679–692.

Stevović D. Kolon. In: Gerzić Z, editor. *Osnovi hirurgije*. 1st ed. Beograd: Medicinska knjiga; 2002. p. 1341-400.

Suzuki, O.; Eguchi, H.; Chika, N.; Sakimoto, T.; Ishibashi, K.; Kumamoto, K.; Tamaru, J.I.; Tachikawa, T.; Akagi, K.; Arai, T.; et al. Prevalence and clinicopathologic/molecular characteristics of mismatch repair-deficient colorectal cancer in the under-50-year-old Japanese population. *Surg. Today* 2017, 47, 1135–1146.

Syngal S., Brand R. E., Church J. M., et al. ACG clinical guideline: genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *The American Journal of Gastroenterology*. 2015;110(2):223–262.

Taille A, Katz A, Bagiella E, Olsson CA, O’Toole KM, Rubin MA. Perineural invasion on prostate needle biopsy: An independent predictor of final pathologic stage. *Urology*. 1999 ;54(6):1039-43.

Tajiri K., Sudou T., Fujita F., Hisaka T., Kinugasa T., Akagi Y. Clinicopathological and corresponding genetic features of colorectal signet ring cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2017;37:3817–3823.

Takagi Y, Kohmura H, Futamura M, et al. Somatic alterations of the DPC4 gene in human colorectal cancers in vivo. *Gastroenterology*. 1996;111:1369–1372.

Takagi Y, Koumura H, Futamura M, et al. Somatic alterations of the SMAD-2 gene in human colorectal cancers. *Br J Cancer*. 1998;78:1152–1155.

Takahashi T, Ishikura H, Motohara T, Okushiba S, Dohke M, Katoh H. Perineural invasion by ductal adenocarcinoma of the pancreas. *J Surg Oncol*. 1997; 65(3):164-70.

Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, et al. Aberrant crypt foci of the colon as the precursor of adenoma and cancer. *N Engl J Med*. 1998;339:1277–1284.

Tejpar S, Saridaki Z, Delorenzi M, Bosman F, Roth AD. Microsatellite instability, prognosis and drug sensitivity of stage II and III colorectal cancer: more complexity to the puzzle. *J Natl Cancer Inst*. 2011;103:841–844.

Thiagalingam S, Laken S, Willson J, et al. Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:2698–2702.

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science (New York, NY)* 1993;260:816–819.

Thirunavukarasu P, Sathaiah M, Singla S, et al. Medullary carcinoma of the large intestine: a population based analysis. *Int J Oncol* 2010;37:901-7.

Titu LV, Monson JR, Greenman J: The role of CD8(+) T cells in immune responses to colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2002; 51: 235-247.

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(15):8681-6.

Tong GJ, Zhang GY, Liu J, et al. Comparison of the eighth version of the American Joint Committee on Cancer manual to the seventh version for colorectal cancer: A retrospective review of our data. *World J Clin Oncol*. 2018;9(7):148-161.

Tuppurainen K., Mäkinen J.M., Juntila O., Liakka A., Kyllönen A.P., Tuominen H., Karttunen T.J., Mäkinen M.J. Morphology and microsatellite instability in sporadic serrated and non-serrated colorectal cancer. *J. Pathol*. 2005;207:285–294.

Turcot J, Despres JP, St Pierre F. Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon: report of two cases. *Dis Colon Rectum*. 1959; 2:465-8.

Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour ‘budding’ as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* 2002;40(2):127–32.

Ueno H., Kajiwara Y., Shimazaki H., Shinto E., Hashiguchi Y., Nakanishi K., Maekawa K., Katsurada Y., Nakamura T., Mochizuki H., et al. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* 2012;36:193–201.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96: 261–8.

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology.* 1999; 116: 1453-6.

Vayrynen JP, Sajanti SA, Klintrup K, et al. Characteristics and significance of colorectal cancer associated lymphoid reaction. *Int J Cancer.* 2014;134(9):2126–2135.

Vidal CI, Sutton A, Armbrect EA, Lee JB, Litzner BR, Hurley MY, Rating Panel. Alam M, Duncan LM, Elston DM, Emanuel PO, Ferringer T, Fung MA, Hosler GA, Lazar AJ, Lowe L, Plaza JA, Robinson JK, Schaffer A. Muir-Torre syndrome appropriate use criteria: Effect of patient age on appropriate use scores. *J. Cutan. Pathol.* 2019;46(7):484-489.

Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol* 2010;7:153-62.

Walsh SV, Carey FA. Malignant epithelial neoplasms of the large bowel. In: Shepherd NA, Warren BF, Williams GT, Greenson JK, Lauwers GY, Novelli MR, editors. *Morson and Dawson's gastrointestinal pathology.* 5th ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2013. p. 685-732.

Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, et al. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2009; 33: 134–41.

Wang Y, Duan H, Yang H, Lin J. A pooled analysis of alcohol intake and colorectal cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(5):6878-6889.

Wang Y, Jacobs EJ, Patel AV, et al. A prospective study of waist circumference and body mass index in relation to colorectal cancer incidence. *Cancer Causes Control.* 2008.

Watson N, Grieu F, Morris M, Harvey J, Stewart C, Schofield L, Goldblatt J, Iacopetta B. Heterogeneous staining for mismatch repair proteins during population-based prescreening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Mol Diagn.* 2007;9(4):472-8.

Watson P, Vasen HF, Mecklin JP, et al. The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int J Cancer*. 2008; 123(2):444-9.

Wei Q., Wang X., Gao J., Li J., Li J., Qi C., Li Y., Li Z., Shen L. Clinicopathologic and molecular features of colorectal adenocarcinoma with signet-ring cell component. *PLoS ONE*. 2016;11:e0156659.

Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2006;38:787–93.

Westra JL, Schaapveld M, Hollema H, et al. Determination of TP53 mutation is more relevant than microsatellite instability status for the prediction of disease-free survival in adjuvant-treated stage III colon cancer patients. *J Clin Oncol* 2005;23:5635-43.

Wittekind C, Compton CC, Sobin LH. Residual tumour classification revisited. *Cancer* 2002; 94: 2511–2516.

Wolin KY, Yan Y, Colditz GA, Lee IM. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2009;100(4):611–616.

Xiong XD, Ren X, Cai MY, Yang JW, Liu X, Yang JM. Long non-coding RNAs: An emerging powerhouse in the battle between life and death of tumor cells. *Drug Resist Updat*. 2016;26:28–42.

Yang A, Sisson R, Gupta A, Tiao G, Geller JI. Germline APC mutations in hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2018 ;65(4).

Yang Y, Huang X, Sun J, Gao P, Song Y, Chen X, et al. Prognostic value of perineural invasion in colorectal cancer: a meta-analysis. *J Gastrointest Surg*. 2015 ;19(6):1113-22.

Yuan L, Chi Y, Chen W, Chen X, Wei P, Sheng W, et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(11):20988–1000.

Zeichner SB, Raj N, Cusnir M, Francavilla M, Hirzel A. A de novo germline APC mutation (3927del5) in a patient with familial adenomatous polyposis: case report and literature review. *Clin Med Insights Oncol*. 2012;6:315–323.

Zeki SS, Graham TA, Wright NA. Stem cells and their implications for colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011;8:90–100.

Zhu H., Qin H., Huang Z., Li S., Zhu X., He J., Yang J., Yu X., Yi X. Clinical significance of programmed death ligand-1 (PD-L1) in colorectal serrated adenocarcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015;8:9351–9359.

Zlobec I, Bihl M, Foerster A, Ruffe A, Lugli A. Comprehensive analysis of CpG island methylator phenotype (CIMP)-high, -low, and -negative colorectal cancers based on protein marker expression and molecular features. *J Pathol.* 2011;225(3):336–343.

Zlobec I, Lugli A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget. *Oncotarget.* 2010 ;1(7):651-61.

Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 2008;61(5):561-9.

MMR - Mismatch repair
dMMR – deficijenti MMR
pMMR – proficijenti MMR
hMMR – heterogeni MMR
MSH2 - mutS homologue 2
MSH6 - mutS homologue 6
MLH1 – mutL homologue 1
PMS2 - post-meiotic segregation increased 2
CRC - Colorectal carcinoma
CIN - hromozomska nestabilnost
MSI - mikrosatelitska nestabilnost
FAP - familijarna adenomatozna polipoza kolona
ACF - aberantni kriptični fokusi
DNK - dezoksiribonukleinska kiselina
5-FU - 5 fluorouracil
LV - leukovorin
NCCN - National Comprehensive Cancer Network
WHO - World Health Organisation
AJCC - American Joint Committee on Cancer
STR - Short Tandem Repeats
APC - Adenomas Polyposis Coli
BRAF - B-raf murine sarcoma viral oncogene
PIK3CA - aktivacija fosfatidil inozitol 3 kinaze
CIMP - CpG Island Methylation Phenotype
HNPCC - Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
IHC – Imunohistohemijska analiza
HE - hematoksilin-eozin
PCR - polimerazne lančane reakcije

CK - citokeratini

ITC - Izolated Tumor Cell

Bd - Tumor budding

ITBCC - International Tumor Budding Conference Consensus

EMT - epitelno-mezenhimna tranzicija

TIL - tumor infiltrišući limfociti

TNM-I - TNM-immunoscore

TNM - (T-dubina invazije tumora, N- zahvaćenost limfnih nodusa, M-prisustvo metastaza)

LVI - limfovaskularna invazija

PNI – perineuralno širenje

ASCO - American Society of Clinical Oncology

ESMO - European Society for Medical Oncology

CAP - College of American Pathologists

Tijana Denčić je rođena 13.05.1982.godine u Nišu. Osnovnu i srednju školu je završila u Nišu sa odličnim uspehom.

Medicinski Fakultet u Nišu je upisala 2001/2002.godine, a diplomirala je 2008.godine sa prosečnom ocenom 9.51.

Nakon obavljenog lekarskog staža, položila je državni ispit.

Radni odnos na neodređeno vreme zasiva 2009.godine u Kliničkom Centru u Nišu, Centar za patologiju i patološku anatomiju.

Specijalizaciju iz Patologije i patološke anatomije je upisala 2013.godine, a specijalistički ispit je položila sa odličnom ocenom 2018.godine.

Doktorske akademske studije na studijskom programu Medicinske nauke je upisala 2015.godine i položila ispite sa prosečnom ocenom 9.87 na Medicinskom Fakultetu Univerzitetu u Nišu.

Izabrana je u zvanje asistenta na predmetu UNO Patologija 2015.godine, na Medicinskom Fakultetu Univerzitetu u Nišu, a reizabrana je u isto zvanje 2018.godine.

Na Medicinskom Fakultetu Univerzitetu u Nišu je prijavila temu za izradu doktorske disertacije pod nazivom: „Ispitivanje povezanosti imunohistohemijske ekspresije enzima popravke replikacionih grešaka DNK sa kliničkim i mikromorfološkim karakteristikama kolorektalnog karcinoma“. Datum i broj odluke o dobijanju saglasnosti za temu doktorske disertacije je: NSV broj 8/19-01-003/20-009; u Nišu, 15.06.2020.godine.

Član je Srpskog Lekarskog Društva i Lekarske Komore Srbije.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом: **Испитивање повезаности имунохистохемијске експресије ензима поправке репликационих грешака ДНК са клиничким и микроморфолошким карактеристикама колоректалног карцинома**

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивала на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредила ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:



Тијана В. Денчић


**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације: **Испитивање повезаности имунохистохемијске експресије ензима поправке репликационих грешака ДНК са клиничким и микроморфолошким карактеристикама колоректалног карцинома**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:



Тијана В. Денчић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом: **Испитивање повезаности имунохистохемијске експресије ензима поправке репликационих грешака ДНК са клиничким и микроморфолошким карактеристикама колоректалног карцинома**


Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство **(CC BY)**
2. Ауторство – некомерцијално **(CC BY-NC)**
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде **(CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима **(CC BY-NC-SA)**
5. Ауторство – без прераде **(CC BY-ND)**
6. Ауторство – делити под истим условима **(CC BY-SA)¹**

У Нишу, _____

Потпис аутора дисертације:



Тијана В. Денчић

¹ Аутор дисертације обавезан је да изабере и означи (заокружи) само једну од шест понуђених лиценци; опис лиценци дат је у наставку текста.

ТИПОВИ ЛИЦЕНЦИ КРЕАТИВНЕ ЗАЈЕДНИЦЕ²

1. Ауторство (CC BY)

Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. Уодносу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

² Више о лиценцама Креативне заједнице на адреси:
http://creativecommons.org.rs/?page_id=74CC. Овај текст НИЈЕ саставни део изјава аутора!